

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3691467号  
(P3691467)

(45) 発行日 平成17年9月7日(2005.9.7)

(24) 登録日 平成17年6月24日(2005.6.24)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

**C 0 7 K 16/28**  
**// A 6 1 K 45/00**  
**A 6 1 P 17/06**  
**A 6 1 P 19/02**  
**A 6 1 P 25/28**

C 0 7 K 16/28 Z N A  
 C 1 2 N 15/00 A  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 19/02

請求項の数 2 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-228802 (P2002-228802)  
 (22) 出願日 平成14年8月6日(2002.8.6)  
 (62) 分割の表示 特願平4-512008の分割  
 原出願日 平成4年5月6日(1992.5.6)  
 (65) 公開番号 特開2003-144181 (P2003-144181A)  
 (43) 公開日 平成15年5月20日(2003.5.20)  
 審査請求日 平成14年8月6日(2002.8.6)  
 (31) 優先権主張番号 695, 805  
 (32) 優先日 平成3年5月6日(1991.5.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 834, 902  
 (32) 優先日 平成4年2月13日(1992.2.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 596168317  
 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
 GENENTECH, INC.  
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408  
 0-4990・サウス・サン・フランシス  
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1  
 (73) 特許権者 500210903  
 ザ、リージェンツ、オブ、ザ、ユニバーシ  
 ティ、オブ、カリフォルニア  
 THE REGENTS OF THE  
 UNIVERSITY OF CALIF  
 ORNIA  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 946  
 07、オークランド、フランクリン・スト  
 リート 1111、トゥエルフス・フロア  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セレクチンリガンド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記図：

【表 1】

(2)

JP 3691467 B2 2005.9.7

1 CTGACCTTGT TCCAGTGCCA CCAATGAAAIT CTTCACTGTC CTGCTATTTG TCAGTCTTGC  
 GACTGGAACA AGGTACGGT GGTACTTTAA GAAGTGACAG GACGATAAAC AGTCAGAACG  
 1 METLYSPH EPHETHRYAL LEULEUPHEV ALSERLEUALA  
 61 TGCCACCTCT CTTGCTCTCC TGCCTGGGTC CAAAGATGAA CTTCAAATGA AGACTCAGCC  
 ACGGTGGAGA GAACGAGAGG ACGGACCCAG GTTCTACTT GAAGTTTACT TCIGAGTCGG  
 14 ALATHRSER LEUALALEUL EUPROGLYSE RLYSASPLU LEUGLNMETL YSTRGLNPRO  
 N-末端  
 121 CACAGATGCC ATTCCAGCTG CCCAGTCCAC TCCCACCAGC TACACCAGTG AGGAGAGTAC  
 GTGCTACGG TAAGGTCGAC GGGTCAGGTG AGGTGGTGG ATGTGGTAC TCCTCTCATG  
 34 THRASPALA ILEPROALAA LAGLNSERTH RPROTHRSEY TYRTHRSEY G LUGLUSERTHR  
 181 TTCAGTAAG GACCTTICCA AGGAGCCTTC CATCTTCAGA GAAGAGCTGA TTTCCAAAGA  
 AAGGTCATTC CTGGAAAGGT TCCTCGGAAG GTAGAAGTCT CTTCTCGACT AAAGTTTCT  
 54 SERSERLYS ASPLEUSERL YSGLUPROSE RILEPHEARG GLUGLULEUI LSEYLYSASP  
 241 TAATGTGGTG ATAGAACTA CCAAGCCAGA GAATCAAGAG GCCCAGGATG GGCTCAGGAG  
 ATTACACCAC TATCTTAGAT GGTTCGGTCT CTTAGTTCTC CGGGTCCTAC CCGAGTCCTC  
 74 ASNVALVAL ILEGLUSERT HRLYSPROGL UASNGLNGLU ALAGLNASPG LYLEUARGSER

10

20

30

40

【表 2】

```

301 CGGGTCATCT CAGCTGGAAG AGACCACAAG ACCACCACC TCAGCTGCCA CCACCTCAGA
GCCCAGTAGA GTCGACCTTC TCTGGTTC TGGGTGGTGG AGTCGACGTT GGTGGAGTCT
94 GLYSESER LUHRTHRAR LUHRTHR SERAALAL HRTHRSERGLU
361 GGAATACTG ACCAAGTCAA GCCAGACAGT GGAGGAAGAA CTGGGTAAA TAATTGAAGG
CCTTTTAGAC TGGTTCAGT CCGTCTGICA CCTCCTTCTT GACCCATTT ATTAACCTCC
114 GLUASNLEU THRLYSERS ERGLNTHRVA LGLUGLUGLU LEUGLYLYSI LEILEGLUGLY
421 ATTTGTAAC TGGTGCAGAAG ACATAATCTC TGGTGCCAGT CGTATCACGA AGTCATGAAG
TAAACATTGA CCACGCTTC TGTATTAGAG ACCACGGTCA GCATAGTGT TCAGTACTTC
134 PHEVALTHR GLYALAGLUA SPILEISE RGLYALASER ARGILETHR LYSER
481 ACAAAAACAC CTAACCAC TAAGTCCATGC TAGGTGGTGC CTTCATCAGC CACATCTGCG
TGTTTTTGTG GATTGGTGAT TCAGGGTACG ATCCACCACG GAAGTAGTCG GTGTAAAGCG
541 TCATCTGACC ACCACCTCTC AGTCTGCCCT TTGATGCTT ACATTAAGT ATTGCAACCT
AGTAGACTGG TGGTGGAGAG TCAGACGGGA AACTACAGAA TGTAATTTCA TAACGTTGGA
601 AAAAAAAA
TTTTTTTTT

```

10

20

30

40

に示されるアミノ酸配列を有する L - セレクチンリガンドの部分に対して免疫反応性の抗体。

【請求項 2】

アミノ酸配列 KEPSIFREELISKD に対して免疫反応性である、請求項 1 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は内皮性セレクチンリガンドに関する。さらに本発明はこれらのリガンドをコード

50

している核酸、およびそれらを製造するための方法および手段に関する。

【 0 0 0 2 】

背景および関連技術の説明

リンパ球は、正常組織の炎症ならびに例えば慢性関節リウマチおよび他の自己免疫疾患において発生する病理学的な組織損傷の媒介物質である。免疫系の抗原性の各種機能を十分に活用するために、脊椎動物は場所の異なる生物の領域へ多様な抗原特異性を有するリンパ球を分配させるための機構を進化させてきた〔Butcher, E. C., *Curr. Top. Micro. Immunol.* 128, 85 (1986); Gallatinら, *Cell* 44, 673 (1986); Woodruffら, *Immunol. Today* 10, 23 (1989); Yednockら, *Adv. Immunol.* 44, 313 (1989)〕。

【 0 0 0 3 】

この機構には、細胞が最も高い移動性を有する血液と、隔離されて加工された抗原とリンパ球が会うリンパ系器官の間のリンパ球の連続的な再循環が含まれる。

【 0 0 0 4 】

血液から第二のリンパ系器官、例えばリンパ節 (LN) および腸関連のパイヤー斑 (PP) へのリンパ球の交通は、高内皮細静脈 (HEV) の分化された内皮細胞との接着性相互作用により開始されることは以前から認められていた〔Bergら, *Immunol. Rev.* 108, 5 (1989); DuijvestijnおよびHamann, *Immunol. Today* 10, 23 (1989); Woodruffら, *Annu. Rev. Immunol.* 5, 201 (1987); YednockおよびRosen, *Adv. Immunol.* 44, 313 (1989); Stoolman, *Cell* 56, 907 (1989)〕。リンパ球のリンパ系器官 - 選択的な移動または「回帰 (homing)」の大きな部分がHEVに対するリンパ球の器官 - 特異的な結合により指図されていることは、多くの証拠により示されている〔Butcher(1986), 上記〕。作用上、HEVとの器官 - 選択的相互作用の基礎となっているリンパ球 - 関連分子は「回帰レセプター」と称され、一方で同種の内皮分子は「HEVリガンド」として知られている〔Gallatinら(1986), 上記; Rosen, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1, 913 (1989)〕。内皮的HEVリガンドは異なるリンパ系器官に対して特徴的であると仮定されており、これらは各クラスのリンパ系器官に入るリンパ球数の調節を担っていることが提唱されている〔Butcher, *Am. J. Pathol.* 136, 3 (1990)〕。リンパ球交通の基礎となっている詳細な分子機構の特徴付けは科学のおよび臨床的な見地の両方から興味あるものであるが、これは正常および病原性の両形態の白血球炎症において同様の接着性の過程が関与しているかもしれないからである〔Watsonら, *Nature* 349, 164-167 (1991)〕。

【 0 0 0 5 】

回帰レセプターの中で、最も詳細に研究されているものは末梢リンパ節回帰レセプター (pnHR) と最初に称されたレセプターである。このレセプターは、ネズミの系においてMEL-14モノクローナル抗体 (mAb) すなわち約90 kDの白血球表面抗原 (gp90<sup>MEL</sup> と称される) を認識することが見いだされた抗体により最初に定義された〔Gallatinら, *Nature* 303, 30 (1983)〕。この抗体は、Stamper-Woodruffインビトロ接着試験において末梢および腸間膜リンパ節のHEVに対するリンパ球の接着をブロックすることおよびインビボでリンパ節への移動を妨げることが見いだされた。gp90<sup>MEL</sup> に対する回帰機能は、界面活性剤により可溶化された可溶性の組換え型のレセプターがLN上のリンパ球に対する接着部位を選択的にブロックすることができるがPPHEV上の接着部位をブロックする事ができないという発見により明確に示された〔GeoffroyおよびRosen, *J. Cell. Biol.* 109, 2463 (1989)〕。

【 0 0 0 6 】

ネズミおよびヒトgp90<sup>MEL</sup>レセプターをコードしているcDNAの分子クローニングにより、細胞外アミノ末端にカルシウム - 型 (C - 型) レクチンドメインを有し、続いてEGFモチーフ、補体結合活性を有するタンパク質において見いだされるモチーフに関連した2つの補体調節モチーフ、トランスメンブラン・ドメインおよび短い細胞質ゾルの尾部を有するトランスメンブランタンパク質が明らかになった〔Laskyら, *Cell* 56, 1045 (1989); Siegelmanら, *Science (Wash., D. C.)* 243, 1165 (1989); Siegelmanら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5562 (1989); Tedderら, *J. Exp. Med.* 170 (1) 123 (1989)

10

20

30

40

50

; Tedderら, J. Immunol. 144, 532 (1989); Bowenら, J. Cell Biol. 109, 421 (1989); Cameriniら, Nature 342 (6245), 78 (1989); 共に出願中の出願番号315,015(1989年2月23日提出); W0 91/08298(1991年6月13日発行)]。

【0007】

他の研究者らは好中球接着に関係する別の分子を同定した。内皮性白血球接着分子ELAM-1と称されるこの分子は誘導性接着分子であり、その役割は炎症部位に隣接する細静脈内皮細胞への好中球の接着を媒介することであろうと提案された〔Bevilacquaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA84, 9238 (1989); Hessionら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA87 (5), 1673 (1990)]。

【0008】

血小板のアルファ顆粒に含まれるタンパク質の研究により、さらに顆粒膜タンパク質-140(GMP-140)、血小板活性化依存性顆粒外膜タンパク質(PADGEM)またはCD62と様々に称される接着分子の発見が導かれた〔McEverら, J. Biol. Chem., 259, 9799 (1984); Bonfantiら, Blood73, 1109 (1989); Hattoriら, J. Biol. Chem. 264 (14), 7768 (1989)]。このレセプターをコードしているcDNA配列はJohnstonら〔Ce 1156,1033(1989)]により決定された。

【0009】

アミノ酸配列の比較により、これらの3つの接着分子は非常に極だった注目に値する様式で関連していることが明らかになった。これらの共通のモザイク構造はカルシウム依存性レクチンまたは炭水化物-結合モチーフ、上皮増殖因子様(EGF)モチーフ、および変動数の補体調節(CR)モチーフからなる。これらのモチーフを順に結合することにより、LEC-CAM〔レクチンEgf補体調節-細胞接着分子(Lectin Egf Complement regulatory-Cell Adhesion Molecule)]という名称が白血球内皮細胞接着分子のこの新しいファミリーに対して与えられている〔Stoolman, Cell 56:907 (1989)]。また、このファミリーに対して「セレクトリン」という名称が適用されている〔Bevilacquaら, Science 243:1160 (1989); Gengら, Nature 343:757 (1990)]。

【0010】

細胞接着分子のLEC-CAMまたはセレクトリンのファミリーの3つの構成員は:L-セレクトリン〔末梢リンパ節回帰レセプター(pnHR)、LEC-CAM-1、LAM-1、gp90<sup>MEL</sup>、gp100<sup>MEL</sup>、gp110<sup>MEL</sup>、MEL-14抗原、Leu-8抗原、TO-1抗原、DREG抗原としても知られる)、E-セレクトリン(L-LEC-CAM-2、LEC-CAM-2、ELAM-1)およびP-セレクトリン(L-LEC-CAM-3、LEC-CAM-3、GMP-140、PADGEM)である。これらのレセプターを以下において「セレクトリン」と称する。セレクトリンファミリー構成員およびそれらをコードしている遺伝子の構造は図1および2にそれぞれ示す。単純な単糖、例えばマンノース-6-ホスフェート(M6P)およびフルクトース-1-ホスフェートがネズミおよびヒトリンパ球の末梢リンパ節(pIn)HEVとの相互作用をブロックし得るという発見〔Stoolmanら, J. Cell Biol. 96, 722 (1983); Stoolmanら, J. Cell Biol. 99, 1535 (1984); Stoolmanら, Blood 70, 1842 (1987)]により、L-セレクトリンにより認識される内皮性リガンドが炭水化物を基本とするものであることが示された。一連の実験において、RosenらはpInHEVに対するリンパ球の回帰レセプター依存性結合が広スペクトルのシアリダーゼによるインビトロまたはインビボ処理のどちらかにより完全に破壊されることを示した〔Rosenら, Science (Wash., D.C.) 228, 1005 (1985); Rosenら, J. Immunol. 142, 1895 (1989)]。この酵素はオリゴ糖から末端シアル酸残基を選択的に除去するから、これらの結果はシアル酸が認識に対する重要な成分であることを強く示唆した。

【0011】

続いてL-セレクトリンにより認識される内皮性分子の性質が、ヒトIgG1重鎖のヒンジ、CH2およびCH3領域に結合させたL-セレクトリンの細胞外ドメインからなる独特の組換えキメラを用いて精査された〔キメラについてはW0 91/08298(1991年6月13日発行)およびリンパ節高内皮細静脈の接着性リガンドに対するプローブとしてのその使

10

20

30

40

50

用についてはWatsonら, J. Cell Biol. 110, 2221 (1990)を参照〕。このいわゆるレセプター - 免疫グロブリンキメラを用いた最初の実験により、このキメラが末梢および腸間膜リンパ節 - 特異的H E Vリガンドに接着し得ることが細胞ブロックおよび免疫組織化学の実験において示された〔Watsonら(1990), 上記〕。このH E Vリガンドの免疫組織化学的な認識はシアリダーゼによるリンパ節切片の処理により完全に破壊され、これにより、L - セレクチンにより認識される炭水化物の構成成分はシアル酸様のものであることが示され、さらにL - セレクチン介在性接着におけるレクチンドメインの重要性が強調された〔Rosenら, Science (Wash. D. C.) 228, 1005-1007 (1985); Rosenら(1989), 上記およびTrueら, J. Cell Biol. 11, 2757-2764 (1990)〕。これらの結果により、L - セレクチン - 免疫グロブリンキメラのpInH E Vリガンドに対する特異性が示され、このリガンドが  
10  
回帰レセプター - 介在性細胞接着に必須の炭水化物残基を表わすことが確かめられた。

【0012】

最近の一連の文献により、E - セレクチンリガンドも炭水化物の特性を有することが確認された。広範囲の研究方法を採用しているいくつかの実験室で、E - セレクチンリガンドはシアリルLewis<sup>x</sup> (sLex)として知られている炭水化物またはC D 6 5もしくはV I M - 2〔NeuAca2 - 3 Galb1 - 4 (Fuca1 - 3) GlcNAcb1〕として知られている密接に関連した構造であることが結論付けられた。Loweら〔Cell 63, 475(1990)〕は非骨髄細胞を $\alpha$ 1, 3/4フコシルトランスフェラーゼでトランスフェクションしてE - セレクチンに対するリガンド活性を生じさせたが、これはsLex決定基の発現と相関していた。Goeltzら〔Cell 63 (6), 1349 (1990)〕は、骨髄細胞中の実際のE L A M - 1リガンド合成に関与して  
20  
いると思われる $\alpha$ 1, 3フコシルトランスフェラーゼを同定しクローン化した。より直接的な研究方法を用いて、Phillipsら〔Science 250(4984), 1130 (1990)〕およびWalzら〔Science 250(4984), 1132 (1990)〕はsLex - 含有糖コンジュゲートまたはsLexに対する抗体のどちらかによるE - セレクチン依存性接着の阻害を示すことができた。リガンド活性におけるシアル酸およびフコース部分両方の重要な関与がこれらの実験において示された。最終的にTiemeyerら〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991)〕は、固相アッセイにおいてE - セレクチンによりトランスフェクションした細胞に対してリガンド活性を有するいくつかの骨髄 - 由来の糖脂質を精製した。精製されたE - セレクチン結合糖脂質の質量分光分析により、活性に必要な最小構造はN - アセチルグルコサミン上に $\alpha$ 1, 3 - 結合したフ  
30  
コースを含有している第二の内部N - アセチラクトサミン単位を有するシリル化ラクト

【0013】

また、P - セレクチンに対するリガンドの同定においても進展があった。Larsenら〔Cell 63, 467 (1990)〕は、骨髄細胞上のP - セレクチンリガンドの重要な成分としてLex決定基〔Galb1 - 4 ( $\alpha$ 1 - 3 Fuc) GlcNAc〕を示唆している。しかし、シアル酸も完全なリガンド活性に対して、おそらく $\alpha$ 2, 3結合において必要とされる〔Corralら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 1349 (1990); Mooreら, J. Cell Biol. 112, 491 (1991)〕。P - セレクチンに対するリガンドはE - セレクチンに対するリガンドと同じであるかまたは非常に似ている可能性があるが、これは特に両セレクチンが非常に似た範囲の細胞種に  
40  
結合するからである〔Poneyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6224 (1991)〕。

【0014】

セレクチン構造における著しい相同性ならびに既に示されたりガンドにおける類似性により、これらリガンドは関連しているが微妙に異なる構造を有するものと示唆される。

【0015】

本発明の目的は、セレクチンリガンドを精製するための方法を提供することである。

【0016】

本発明の別の目的は、精製されたセレクチン、特にL - セレクチンのリガンドを提供することである。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明のさらに別の目的は、セレクチン糖タンパク質リガンドをコードしている核酸配列を提供することである。

【0018】

他の目的は、セレクチンリガンドのアミノ酸配列を決定すること、およびこれらリガンド上の(O-およびN-結合性)グリコシル化部位を同定することである。さらに他の目的は、天然には見られないセレクチンリガンドのアミノ酸配列および/またはグリコシル化変異体の製造を可能にすることである。

【0019】

さらに別の態様において本発明は、炭水化物を基本とするセレクチンリガンドの決定基に類似したセレクチン阻害物質を設計する方法を提供する。

10

【0020】

本発明のこれらおよび他の目的は当業者には明らかであろう。

【0021】

発明の要旨

H E V - 関連リガンドについての本発明者らの最初の分析は、H E V 代謝の独特の態様を利用するものであった。Andrewsらによる初期の研究〔J. Cell Sci. 57, 277 (1982)〕により、本来の位置のH E Vは大量の無機スルフェートを高分子中に取り込むという点において特徴的であることが示された。ゆえに、本発明者らは器官培養において<sup>35</sup>S - 硫酸塩でラベルされたリンパ節から無機硫酸塩 - ラベル化物質を沈殿させるL - セレクチン - I g Gキメラの能力を分析した。顕著な50 kD成分および比較的弱い90 kD分子(SgP<sup>50</sup>およびSgp<sup>90</sup>)がリンパ節から沈殿したが、これらは試験した他のどの器官においても存在しなかった。L - セレクチン - I g Gキメラを用いたこれらの成分の沈殿はカルシウム - 依存性であり、M E L - 14 mAbおよび特異的な炭水化物の両方に感受性であることが示された。この反応は、硫酸塩 - ラベル化タンパク質のシアリダーゼによる処理または炭水化物ポリマーであるフコイジンを含む反応中に含まれることにより完全に阻害することができた。最終的に、pInH E Vのいわゆる「血管性アドレシンス(addressins)」と選択的に反応してリンパ球に対する接着をブロックするM E C A - 79と称するモノクローナル抗体が両成分を沈殿させた。予備的な生化学的分析により、~50 kDおよび~90 kDのL - セレクチンリガンドはトリプシン - 感受性の糖タンパク質であり、主にO - 結合性の鎖を含んでいることが明らかになった〔Imaiら, J. Cell Bio1. 113, 1213(1991)を参照〕。

O - 結合性鎖の発見は、O - 結合性領域が細胞表面糖タンパク質を非常に拡張された堅い構造にし〔Jentoftら, Trends in Biochem Sci. 15, 291 (1990)〕、従って認識機能を発揮するためにそれを理想的に配置することが明らかであるので重要である。フコース、硫酸塩およびシアル酸がこれらの分子のO - 結合性鎖において見られ、フコースはシアル酸と同様に完全なリガンド活性にとって必要であると考えられている。

20

30

【0022】

L - セレクチンにより認識される内皮性リガンドの性質をさらに特徴付けるために、本発明者らは硫酸化した~50 kDH E V糖タンパク質をL - セレクチン - I g Gキメラを用いてアフィニティー精製するという新規な研究方法を採用した。精製した糖タンパク質をN末端アミノ酸配列決定法に供し、この配列情報を利用してこのL - セレクチンリガンドのタンパク質成分をコードしているc D N Aをクローン化した。このc D N Aは、L - セレクチンのレクチンドメインに炭水化物を提供する足場として機能するらしいO - 結合に富む(ムチン様)新規な糖タンパク質をコードすることが見いだされた。実験の詳細ならびにこの発見およびその説明は実施例中に提供する。

40

【0023】

本発明は、セレクチンリガンドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【0024】

好ましくは、該核酸分子は図4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列からなる。

50

## 【 0 0 2 5 】

別の態様において、該核酸分子は図 4 に示すアミノ酸配列と約 4 0 % より大きい相同性を有するアミノ酸配列を有するセレクチンリガンドタンパク質をコードしているヌクレオチド配列からなる。

## 【 0 0 2 6 】

さらに別の態様において、該核酸分子は以下の ( a ) ~ ( c ) からなる群から選択される：

( a ) 天然のセレクチンリガンド遺伝子のコード化領域由来のヌクレオチド配列を有している c D N A クローン；

( b ) ( a ) のクローンに低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る D N A 配列；および

( c ) セレクチン分子の天然に存在するリガンドの生物学的性質を有する糖タンパク質をコードする ( a ) および ( b ) の任意の D N A 配列の遺伝的変異体。

## 【 0 0 2 7 】

さらに本発明の核酸分子は免疫グロブリン定常ドメインをコードしているヌクレオチド配列を含んでいてよい。

## 【 0 0 2 8 】

別の態様において本発明は、発現媒体であって、該媒体で形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に機能的に結合されたセレクチンリガンド、好ましくは L - セレクチンリガンドをコードしているヌクレオチド配列を含む発現媒体に関する。

## 【 0 0 2 9 】

また別の態様において、本発明は上記の発現媒体で形質転換された宿主細胞および該形質転換宿主細胞を培養してセレクチンリガンドを発現させる方法に関する。

## 【 0 0 3 0 】

さらに別の態様において、本発明はセレクチン分子の天然に存在するリガンドの生物学的性質を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに関する。該ポリペプチドは内皮細胞表面糖タンパク質の細胞外領域を含んでいてよい。別の態様において、該ポリペプチドは S gp 5 0 または S gp 9 0 である。

## 【 0 0 3 1 】

本発明のポリペプチドは、好ましくはセレクチン - 結合部分をそのレセプターに供することが可能な立体構造を有するアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 3 2 】

特定の態様において、前述のポリペプチドは図 4 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズし得る核酸によりコードされるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 3 3 】

さらに特定の態様において、上記のポリペプチドは同じ動物種の天然に存在する他のタンパク質を実質的に含まない天然のセレクチンリガンドである。

## 【 0 0 3 4 】

さらに別の態様において、本発明は上に定義したポリペプチドであって、さらに免疫グロブリン定常ドメイン配列を含むポリペプチドに関する。

## 【 0 0 3 5 】

他の態様において本発明は、上に定義したポリペプチド ( 糖タンパク質セレクチンリガンド ) を、対応するセレクチンレセプターのその天然リガンドに対する結合を有効にブロックする量で非毒性の薬学的に許容し得る賦形剤と共に含む組成物に関する。

## 【 0 0 3 6 】

別の態様において、本発明は循環白血球の内皮細胞への過剰な結合と関連した徴候または症状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に、循環白血球上の L - セレクチンレセプターのその内皮リガンドに対する結合をブロックするに有効な量で上に定義したポリペプチドを投与することからなる方法に関する。

## 【 0 0 3 7 】

また別の態様において、本発明はセレクチンリガンドのタンパク質部分に対して免疫反応性の抗体に関する。好ましい抗体は各々のセレクチンリガンドと結合するが、他の任意の既知のリガンドとは実質的に交差 - 反応せず、セレクチンリガンドのそのレセプターに対する結合を妨げるであろう。抗 - セレクチンリガンド抗体は固定化することができ、この形態では、例えば本発明のセレクチンリガンドの検出または精製に有用である。

## 【 0 0 3 8 】

さらに別の態様において、本発明は以下の方法からなるセレクチンリガンドの存在を測定するための方法に関する：

- a) セレクチンリガンドをコードしている核酸または該核酸の相補鎖を核酸の試験サンプルにハイブリダイズさせるか；または
- b) セレクチンリガンドをコードしている核酸に基づくプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い；そして
- c) セレクチンリガンドの存在を測定する。

## 【 0 0 3 9 】

さらに別の態様において、本発明はセレクチンリガンドを精製するための方法であって、対応するセレクチンおよび免疫グロブリン重鎖配列を含むキメラに該リガンドを吸収させることからなる方法を提供する。

## 【 0 0 4 0 】

さらに本発明はセレクチン - 結合部分に対応するセレクチンに供する方法であって、セレクチンリガンド糖タンパク質のタンパク質コアに該部分を結合させることによる方法に関する。

## 【 0 0 4 1 】

## I. 定義

「セレクチンリガンド」の用語およびその文法的な変化形は、セレクチン分子の天然に存在するリガンドと共通する質的な生物学的性質を有するポリペプチドを指すのに用いる。

## 【 0 0 4 2 】

本明細書中の「生物学的性質」は、セレクチン分子の天然に存在するリガンドまたはその任意の結果物により直接または間接的に発揮されるインピボでのエフェクターまたは抗原性の機能または活性を意味する。エフェクター機能にはレセプター結合、あらゆる酵素活性または酵素変調活性、あらゆる担体結合活性、あらゆるホルモン活性、細胞外マトリックスまたは細胞表面分子への細胞の接着を促進または阻害するあらゆる活性、またはあらゆる構造的な役割が含まれる。抗原性の機能とはセレクチン分子の天然に存在するリガンドに対して生成させた抗体と交差反応し得るエピトープまたは抗原性部位の保持を本質的に意味する。

## 【 0 0 4 3 】

「生物学的に活性な」セレクチンリガンドはセレクチン分子の天然に存在するリガンドのエフェクター機能を共有し、これはさらに抗原性機能を有することもあるがその必要はない。

## 【 0 0 4 4 】

本発明の目的のために定義したセレクチンリガンドは、好ましくはセレクチンに結合する質的な能力を有し、セレクチンのレクチンドメインにその炭水化物を供することができる O - 結合に富むムチン型の棒状の構造を有する配列を含む。

## 【 0 0 4 5 】

さらに好ましい態様において、セレクチンリガンドは図 4 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の相補鎖と（低ストリンジエンシー条件下で）ハイブリダイズし得るヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 4 6 】

セレクチンリガンドのタンパク質コアのアミノ酸配列は、図 4 に示すアミノ酸配列と好ましくは約 40% 相同より大きく、より好ましくは約 60% 相同より大きく、さらに好まし

くは約70%相同より大きく、またさらに好ましくは約80%相同より大きく、そして最も好ましくは少なくとも約90%相同である。

【0047】

「相同」とは、配列を整列させて必要なら最大パーセントの相同を得るために間隙を導入した後に図4に示すアミノ酸配列中の残基と同一の候補アミノ酸配列中の残基の百分率と定義される。

【0048】

「セレクトインリガンド」の用語は、セレクトイン分子の天然に存在するリガンドが保持する生物学的性質を質的に保有し、かつ好ましくはそれらのレセプターに結合する質的な能力を有するならば、天然のセレクトインリガンドのアミノ酸およびグリコシル化変異体ならびにその誘導体、例えば共有結合修飾により得られる誘導体を特に包含する。

10

【0049】

該用語は、安定な血漿タンパク質に融合させたセレクトインの天然に存在するリガンドと共通した生物学的性質を有するアミノ酸配列を含む糖タンパク質を特に包含する。

【0050】

「安定な血漿タンパク質」とは通常は約30から約2000残基を有するタンパク質であり、その天然の環境において循環中の長い半減期、すなわち約20時間より大きな半減期を示すタンパク質である。適当かつ安定な血漿タンパク質の例として免疫グロブリン、アルブミン、リボタンパク質、アポリボタンパク質およびトランスフェリンが挙げられる。天然に存在するセレクトインリガンドと共通する質的な生物学活性を有するアミノ酸配列は、通常C末端で安定な血漿タンパク質配列、例えば免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。

20

【0051】

「免疫グロブリン」の用語は通常軽鎖または重鎖を含むポリペプチドであって両方が通常は天然の“Y”配置にジスルフィド結合されたものを示すが、それらの間の他の結合(それらの四量体または集合体を含む)は本発明の範囲内にある。

【0052】

免疫グロブリン(Ig)およびその特定の变異体は既知であり、多くは組換え細胞培養において製造されている。例えば、米国特許4,745,055; EP256,654; Faulknerら, Nature 298:286(1982); EP120,694; EP125,023; Morrison, J. Immun. 123:793(1979); Kohlerら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:2197(1980); Rasoら, Cancer Res. 41:2073(1981); Morrisonら, Ann. Rev. Immunol. 2:239(1984); Morrison, Science 229:1202(1985); Morrisonら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6851(1984); EP255,694; EP266,663; およびW088/03559を参照。また、再分類された免疫グロブリン鎖が知られている。例えば、米国特許4,444,878; W088/03565; およびEP68,763およびそれらの中で引用されている文献を参照。リガンド結合タンパク質-安定な血漿タンパク質キメラおよび特にL-セレクトイン-免疫グロブリンキメラは、例えばW091/08298(1991年6月13日発行)中に開示されている。本発明のキメラにおける免疫グロブリン部分はIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプ、IgA、IgE、IgDまたはIgMから得ることができるが、IgG1またはIgG3が好ましい。

30

40

【0053】

セレクトイン、例えばL-セレクトインの結合は、Imaiら〔J. Cell Biol. 113, 1213(1991)〕により本質的に開示されているように、例えば放射ラベル化(例えば<sup>35</sup>S-ラベル化)リガンドの固定化レセプター-免疫グロブリンキメラに対する結合を可溶性の阻害物質の存在または不在で測定することによりアッセイすることができる。別法としてまたはさらに、各々のレセプターを発現している細胞に対する接着を用いてリガンドの結合をアッセイすることができる。例えば、EL-4細胞(ATCC TIB39)はその表面に高レベルのL-セレクトインを発現することが知られており、ゆえにL-セレクトインリガンドに対する細胞接着アッセイにおいて用いることができる。接着細胞は乳酸デヒドロゲナーゼ活性により定量することができる〔Bradleyら, J. Cell. Biol. 105, 991(1987)〕。

50

## 【 0 0 5 4 】

「...をコードしている核酸分子」、「...をコードしているDNA配列」および「...をコードしているDNA」の用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクオチドの順序または配列を示す。これらのデオキシリボヌクオチドの順序によりポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序が決定される。このようにしてDNA配列はアミノ酸配列をコードする。

## 【 0 0 5 5 】

核酸またはタンパク質と関連して用いる「単離された」という用語は、その天然の供給源において通常伴なわれる少なくとも1つの汚染性核酸またはタンパク質から同定および分離された核酸またはタンパク質を指す。単離された核酸またはタンパク質は天然に見られるものとは異なる形または配置で存在する。しかし、セレクトインリガンドをコードしている単離された核酸には、核酸が天然細胞の染色体位置とは異なる位置にあるか、またはその他では天然に見られるDNA配列とは異なる配列と境界を接しているセレクトインリガンドを通常発現している細胞中の核酸が含まれる。

10

## 【 0 0 5 6 】

「低ストリンジェンシー条件」は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%硫酸デキストラン、および20µg/mlの変性勇断サケ精子DNAからなる溶液中、37℃で一晩のインキュベーションとその後の1×SSC中、約50µmのフィルターを洗浄をいう。

20

## 【 0 0 5 7 】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係になるよう配置されているとき「機能的に結合」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーのためのDNAは、もしそれがポリペプチドの分泌に関係するプレタンパク質として発現されるならポリペプチドをコードしているDNAに機能的に結合されており；プロモーターまたはエンハンサーは、もしそれが配列の転写に影響を及ぼすならコード化配列に機能的に結合されており；また、リボソーム結合部位はもしそれが翻訳を容易にするように配置されるならコード化配列に機能的に結合されている。「機能的に結合」とは、通常、結合されたDNA配列が隣接しており、分泌リーダーの場合には隣接しており読み取り相内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。結合は都合のよい制限部位での連結により行う。もしそのような部位が存在しないならば、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを常法に従い用いる。

30

## 【 0 0 5 8 】

「複製可能な発現媒体」および「発現媒体」の用語は、通常二本鎖の外來DNA片をその中に挿入することができるDNA片を示す。外來DNAは異種DNAとして定義され、これは宿主細胞中には天然には見られないDNAである。この媒体を用いて外來または異種DNAを適当な宿主細胞中に移入する。宿主細胞中で媒体が宿主染色体DNAとは独立して複製することができたなら、媒体およびその挿入された(外來)DNAのいくつかのコピーを生成することができる。さらに、該媒体は外來DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にする必要成分を含む。このようにして、外來DNAがコードする多くのポリペプチド分子を迅速に合成することができる。

40

## 【 0 0 5 9 】

本発明の文脈において、「細胞」、「セルライン」および「細胞培養物」の表現は交換可能に用いられ、このような表示の全ては子孫を含む。さらに全ての子孫が意図的または偶然の突然変異により、DNA内容において正確に同一ではないこともあることは理解されるであろう。元の形質転換細胞においてスクリーニングしたときに同じ機能または生物学的性質を有する突然変異子孫が包含される。

## 【 0 0 6 0 】

「形質転換された宿主細胞」および「形質転換された」の用語は細胞へのDNAの導入を意味する。細胞は「宿主細胞」と称され、原核細胞または真核細胞であってよい。通常の

50

原核宿主細胞にはE. coliの様々な株が含まれる。通常の真核宿主細胞は哺乳動物、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞またはヒト胎児腎臓293細胞である。導入されるDNAは通常挿入されたDNA断片を含有するベクターの形態にある。導入されるDNA配列は宿主細胞と同じ種からまたは宿主細胞とは異なる種から得てよく、また、一部の外来DNAと一部の同族DNAを含有しているハイブリッドDNA配列であってもよい。

【0061】

「連結」は2つの核酸フラグメントの間にホスホジエステル結合を形成させる過程を意味する。DNAフラグメントを共に連結するために、それらの末端は適合性でなければならない。いくつかの場合において、末端はエンドヌクレアーゼ消化の後に直接適合性となるであろう。しかし、エンドヌクレアーゼ消化の後に通常生成する付着末端を最初に平滑末端に変換して連結用にそれらを適合性にする必要があることもある。平滑末端にするために、DNAを適当な緩衝液中、15℃で少なくとも15分間、約10単位のDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントまたはT4 DNAポリメラーゼを4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下で用いて処理する。次いで該DNAをフェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製する。共に連結すべきDNAフラグメントを約等モル量で溶液に入れる。さらに該溶液は、ATP、リガーゼ緩衝液、およびT4 DNAリガーゼなどのリガーゼをDNA0.5µg当たり約10単位で含むであろう。DNAをベクター中に連結するときには、ベクターをまず適当な制限エンドヌクレアーゼを用いて線状にする。次いで線状にされたフラグメントを細菌性アルカリホスファターゼまたは子ウシ腸ホスファターゼで処理して連結工程中の自己一連結を防ぐ。

10

20

【0062】

「アミノ酸」および「複数のアミノ酸」の用語は、天然に存在する全てのL-α-アミノ酸を意味する。この定義はノルロイシン、オルニチン、およびホモシステインを含むことを意図している。アミノ酸は一文字または三文字表記のどちらかにより識別される：

A s p	D	アスパラギン酸	I l e	I	イソロイシン
T h r	T	トレオニン	L e u	L	ロイシン
S e r	S	セリン	T y r	Y	チロシン
G l u	E	グルタミン酸	P h e	F	フェニルアラニン
P r o	P	プロリン	H i s	H	ヒスチジン
G l y	G	グリシン	L y s	K	リシン
A l a	A	アラニン	A r g	R	アルギニン
C y s	C	システイン	T r p	W	トリプトファン
V a l	V	バリン	G l n	Q	グルタミン
M e t	M	メチオニン	A s n	N	アスパラギン。

30

【0063】

これらアミノ酸はその側鎖の化学的組成および性質により分類することができる。これらは大きくは2つのグループ、荷電および非荷電のグループに分類される。これらのグループの各々はアミノ酸をより正確に分類するためにサブグループに分割される：

I. 荷電アミノ酸

酸性残基：アスパラギン酸、グルタミン酸

塩基性残基：リシン、アルギニン、ヒスチジン

40

【0064】

II. 非荷電アミノ酸

親水性残基：セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン

脂肪族残基：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン

非極性残基：システイン、メチオニン、プロリン

芳香族残基：フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン。

【0065】

「改変」、「アミノ酸配列の改変」、「変異体」および「アミノ酸配列変異体」は、セレクチン、例えばL-セレクチンのリガンドの天然の配列と比較したときにそのアミノ酸配

50

列においていくらかの相違を有する分子を意味する。通常、変異体は天然のセレクチンリガンドと少なくとも70%の相同性を有するであろうが、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%の天然セレクチンリガンドとの相同性を有するであろう。本発明の範囲内にあるアミノ酸配列変異体は、天然セレクチンリガンドのアミノ酸配列内の特定の位置に置換、欠失、および/または挿入を有する。置換による変異体は、天然の配列において少なくとも1個のアミノ酸残基が除去されて同じ位置に異なるアミノ酸が挿入されたものである。置換は1個(分子中の唯一のアミノ酸が置換される)であってよく、また、多数(同じ分子中で2またはそれ以上のアミノ酸が置換される)であってもよい。

【0066】

リガンドの性質における大きな変化は、電荷および/または構造において天然のアミノ酸とは有意に異なる側鎖を有するアミノ酸と置換することにより得ることができる。この型の置換はポリペプチドの背骨構造および/または置換領域における分子の電荷または疎水性に影響を及ぼすことが予想されるであろう。

【0067】

電荷および/または構造が天然分子と似ている側鎖を有するアミノ酸と置換することにより、リガンドの性質の穏やかな変化が予想される。保存的置換と称されるこの型の置換は、ポリペプチドの背骨構造または置換領域における分子の電荷もしくは疎水性のどちらも大きく改変されることは予想されないであろう。

【0068】

挿入変異体は、天然セレクチンリガンド配列中の特定位置のアミノ酸に直接隣接して1またはそれ以上のアミノ酸が挿入された変異体である。アミノ酸に直接隣接してとは、アミノ酸の -カルボキシまたは -アミノ官能基のどちらかに結合されることを意味する。その挿入は1またはそれ以上のアミノ酸であってよい。通常、この挿入は1または2個の保存的アミノ酸からなるであろう。挿入部位に隣接するアミノ酸に電荷および/または構造が似ているアミノ酸は保存的であると定義される。また、本発明は挿入部位に隣接するアミノ酸とは実質的に異なる電荷および/または構造を有するアミノ酸の挿入を包含する。

【0069】

欠失変異体は、天然のセレクチンリガンドアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が除去された変異体である。通常、欠失変異体は1または2個のアミノ酸が分子の特定の領域において欠失されているであろう。

【0070】

本発明のセレクチンリガンドのタンパク質コアの必須の役割は、セレクチンレセプターにより認識される特異的な炭水化物構造を各々のレセプターに対して提供することである。

【0071】

従って、L-セレクチンリガンドアミノ酸配列の2つの高度にO-グルコシル化された、セリンおよびトレオニンに富む領域(図4中のアミノ酸42~63およびアミノ酸93~122)内のあらゆる改変は、タンパク質の他の領域における変化よりもリンパ球-高内皮細静脈相互作用に対して一層有意な効果を有することが予想される。以下に示すように、高度O-グルコシル化領域は、セリンおよびトレオニン残基に接着した多数のO-結合性炭水化物リガンドが白血球表面局在化L-セレクチンのレクチンドメインに対して適切に提供されるのを可能にし、これにより炭水化物依存性の接着相互作用を媒介する、堅い剛直な「瓶洗いブラシ」構造を得るのに必須である。これらの領域内の改変は、レセプター結合活性が対応する天然リガンドのものとは有意に異なるであろう分子を与える結果になることが予想される。

【0072】

本発明の糖タンパク質リガンドには、フコース、シアル酸および陰イオン性成分、好ましくはO-結合性炭水化物成分として硫酸エステルが含まれ、そしてシアル酸と同様にフコースおよび硫酸エステルが完全なリガンド活性のために必要であると考えられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 3 】

本発明の糖タンパク質リガンドの具体的な炭水化物成分の例は以下のように表記することができる：

NeuNAc 2-3Gal 1-4(Fuc 1-3)GlcNAc

NeuNAcA2-3Gal 1-4GlcNAcB1-3GalB1-4(FucA1-4(FucA1-3)GlcNAc).

## 【 0 0 7 4 】

「ノーザンプロット分析」は、既知のプローブ、例えばオリゴヌクオチド、DNAフラグメント、cDNAまたはそのフラグメント、またはRNAフラグメント等にハイブリダイズするRNA配列を同定するために用いられる方法である。該プローブは<sup>32</sup>Pなどの放射性同位元素を用いて、またはビオチン化により、または酵素を用いてラベルする。分析すべきRNAは、当分野で周知の標準的な方法を用いて〔例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989のセクション7.39~7.52に開示されているように〕、通常アガロースまたはポリアクリルアミドゲル上で電気泳動により分離し、ニトロセルロース、ナイロン、または他の適当な膜に移し、プローブとハイブリダイズさせる。

10

## 【 0 0 7 5 】

「オリゴヌクレオチド」は、既知の方法により〔例えばホスホトリエステル、亜リン酸、またはホスホルアミダイト化学、EP 266, 032 (1988年5月4日発行)に開示されているような固相法を用いて、またはFroehlerら、Nucl. Acids Res. 14, 5399 (1986)により開示されているデオキシヌクレオシドH-ホスファネート中間体を経て〕、化学的に合成される短い一本または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドである。次いでそれらをポリアクリルアミドゲルで精製する。

20

## 【 0 0 7 6 】

本明細書中で用いる「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」の方法は、通常核酸、RNAおよび/またはDNAの微量の特定断片を、米国特許番号4,683,195 (1987年7月28日発行)およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 1991, Volume 2, Chapter15に記載されているように増幅させる方法を指す。

## 【 0 0 7 7 】

「形質転換」は、DNAが複製可能であるようにDNAを染色体外成分としてまたは染色体組込みにより生物に導入することを意味する。

30

## 【 0 0 7 8 】

「トランスフェクション」は、任意のコード化配列が実際に発現されるか否かを問わず宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味する。

## 【 0 0 7 9 】

「処置」、「処置する」の用語およびその文法的な変化形は最も広い意味で用い、ある種の所望でない徴候または状態を予防および改善することを含む。

## 【 0 0 8 0 】

「気相微量配列決定」は以下の方法に基づいて行った。精製したタンパク質を、120A PTHアミノ酸アナライザーを装着したモデル470A Applied Biosystems気相シーケンサーを用いて自動化エドマン分解により直接配列決定したか、または様々な化学物質または酵素を用いて消化した後に配列決定した。Chrom Perfectデータシステム (Justice Innovations, Palo Alto, CA) を用いてPTHアミノ酸をまとめた。配列の解釈はVAX 11/785 Digital Equipment CorporationコンピューターでHenzelら [J. Chromatography 404, 41 (1987)] の開示のように行った。いくつかの場合においては、HPLC分画の一部を5~20% SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、PVD F膜 (ProBlott, ABI, Foster City, CA) に電気移動させてクーマシー・ブリリアント・ブルーで染色する [Matsudaira, P. J., Biol. Chem. 262, 10035 (1987)]。特定のタンパク質をN末端配列決定のためにプロットから切り出した。内部タンパク質配列を決定するために、HPLC分画を真空下で乾燥し (SpeedVac)、適当な緩衝液中に再懸濁し、臭化シ

40

50

アン、リシン - 特異的酵素 L y s - C (Wako Chemicals, Rickmond, VA) または A s p - N (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) で消化した。消化後、得られたペプチドを混合物として配列決定するか、または 0 . 1 % TFA 中のプロパノール勾配で展開した C 4 カラムの H P L C により分離した後に上記のように配列決定する。

【 0 0 8 1 】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」は実質的に同種の抗体の群から得られる抗体を意味する。すなわち少量で存在することがある天然の可能な突然変異体を除いて、群を構成している個々の抗体が同一である群から得られる抗体を示す。ゆえに修飾語句「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。

【 0 0 8 2 】

本発明の範囲内に含まれるモノクローナル抗体は、起源の種または免疫グロブリンのクラスもしくはサブクラス名称を問わず、抗 - セレクチンリガンド抗体の可変 (超可変を含む) ドメインと定常ドメインのサプライスによって製造されるハイブリッドおよび組換え抗体 (例えば「ヒト化」抗体) を含む (その一方だけがセレクチンリガンドに対して指向性である)、軽鎖と重鎖または 1 つの種から得た鎖と別の種から得た鎖のサプライスによる抗体、または異種タンパク質との融合体、ならびに抗体フラグメント [例えば、Fab、F (ab')<sub>2</sub> および Fv] を含む [Cabillyら, 米国特許番号 4, 816, 567; Mage & Lamoyi, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 中, pp.79-97 (Marcel Dekker, Inc., NewYork, 1987)]。

【 0 0 8 3 】

従って、修飾語句「モノクローナル」はそのような実質的に同種の抗体の群から得られる抗体の特徴を示すものであり、任意の特定方法による抗体の製造を必要とすると解釈すべきではない。

【 0 0 8 4 】

II . 一般的方法

A . セレクチンリガンドをコードしている DNA の入手

セレクチンリガンドをコードしている DNA は、セレクチンリガンドに対する mRNA を保持し、かつそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製される任意の c DNA ライブラリーから入手することができる。ゆえに L - セレクチンリガンド遺伝子は、(腸間膜または末梢) リンパ節から調製された c DNA ライブラリーから得ることができる。他のセレクチンリガンドをコードしている遺伝子は他の c DNA ライブラリーから類似の方法で調製することができる。

【 0 0 8 5 】

ライブラリーを、所望の遺伝子またはそれによりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブを用いてスクリーニングする。c DNA 発現ライブラリーのための適当なプローブには、通常、所望のタンパク質を認識して特異的に結合するモノおよびポリクローナル抗体; 同一または異なる種由来のセレクチンリガンド c DNA の既知または推測の部分をコードする長さが約 20 ~ 80 塩基のオリゴヌクレオチド; および/または同一もしくは類似の遺伝子をコードする相補的または相同の c DNA またはそれらのフラグメントが含まれる。

【 0 0 8 6 】

セレクチンリガンド、例えば L - セレクチンリガンドをコードしている遺伝子を単離するための別の手段は、Sambrookら, 上記のセクション 1 4 または *Current Protocols in Molecular Biology*, 上記の Chapter 1 5 中に開示されているようにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を使用するものである。

【 0 0 8 7 】

また別の方法は、所望のセレクチンリガンドをコードしている遺伝子を Engelsら [ *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, 716 (1989)] が開示している方法のうちの 1 つを用いて化学的に合成するものである。これらの方法にはトリエステル、亜リン酸エステル、ホスホルアミダイトおよび H - ホスホネート法、PCR および他の自動プライマー法、および固相

10

20

30

40

50

支持体上でのオリゴヌクレオチド合成が含まれる。これらの方法は遺伝子の全核酸配列が既知であるかまたは暗号鎖に対して相補的な核酸の配列が利用可能である場合に用いることができ、または別法では標的アミノ酸配列が既知であるならば、各アミノ酸残基に対する既知のそして好ましい暗号残基を用いて可能性のある核酸配列を推測することができる。

#### 【0088】

本発明の実施のために好ましい方法は、注意深く選択されたオリゴヌクレオチド配列を用いて様々な組織、好ましくは哺乳動物リンパ節高内皮細静脈（L-セレクトインリガンド）、または骨髓細胞（E-セレクトインおよびP-セレクトインリガンド）由来のcDNAライブラリーをスクリーニングするものである。好ましい哺乳動物の中には、ヒトおよび次の

10

#### 【0089】

プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性が最小限になるよう十分に明白な十分な長さのものであるべきである。実際のヌクレオチド配列は、通常セレクトインリガンド（例えばL-セレクトインリガンド）の保存的または高度に相同なヌクレオチド配列または領域に基づいている。

#### 【0090】

上述の方法を用いるハイブリダイゼーションにより、図4に示すDNAを用いて他のセレクトインリガンドをコードしているDNAを単離するかまたはL-セレクトインリガンドをコードしているDNAを別の動物種から単離することができる。好ましい動物は哺乳動物、特にヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ、ネコ、イヌおよび齧歯動物であり、とりわけヒト、ウシ、ラットおよびウサギである。

20

#### 【0091】

##### B. アミノ酸配列変異体の構築

本発明のセレクトインリガンドのアミノ酸配列変異体は、好ましくは野生型セレクトイン、例えばL-セレクトインリガンドのタンパク質コアをコードするDNA配列を突然変異させることにより構築する。通常、DNAの特定の領域または部位が突然変異誘発の標的となり、ゆえにこれを行うのに用いられる常法は部位特異的突然変異誘発と称される。突然変異はDNA修飾酵素、例えば制限エンドヌクラーゼ（特定の位置でDNAを切断する）、ヌクレアーゼ（DNAを分解する）および/またはポリメラーゼ（DNAを合成する）を用いて行う。

30

#### 【0092】

##### 1. 単純欠失および挿入

Sambrookら（上記）のセクション15.3に開示されているように、DNAの制限エンドヌクレアーゼ消化とそれに続く連結を欠失を生じさせるのに用いることができる。この方法を使用するために、外来DNAをプラスミドベクターに挿入するのが好ましい。外来（挿入された）DNAおよびベクターDNAの両方の制限地図が利用可能でなければならないか、または、外来DNAおよびベクターDNAの配列が既知でなければならない。外来DNAはベクターには存在しない独特の制限部位を有していなければならない。次いで適当な制限エンドヌクレアーゼを用い酵素の製造者により示された条件下で、外来DNAにおいてこれらの独特の制限部位の間でこれを消化することにより欠失を行う。用いられる制限酵素が平滑末端または適合性末端を造るなら、Sambrookら（上記）のセクション1.68に開示されているように該末端をバクテリオファージT4 DNAリガーゼなどのリガーゼを用いて混合物を16で1~4時間、ATPおよびリガーゼ緩衝液の存在下でインキュベートすることにより共に直接連結することができる。該末端が適合性でないならば、それらをまずDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントまたはバクテリオファージT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑にしなければならないが、その両方は消化されたDNAの突出している一本鎖末端を充填するために4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸を必要とする。別法では、該末端をヌクレアーゼ、例えばヌクレアーゼS1またはヤエナリヌクレアーゼを用いて平滑化することができる（その両方はDNAの突出している

40

50

一本鎖を短く切り込むことにより機能する)。次いで該DNAをリガーゼを用いて再連結する。得られる分子は欠失変異体である。

【0093】

Sambrookら(上記)のセクション15.3に開示されているように類似の方法を用いて挿入変異体を構築することができる。外来DNAの独特の制限部位(複数の部位)での消化の後に、オリゴヌクレオチドを外来DNAが切断された部位に連結する。該オリゴヌクレオチドは挿入すべき所望のアミノ酸をコードするように設計され、さらに指向性の連結が可能となるように消化された外来DNA末端と適合性の5'および3'末端を有する。

【0094】

2. オリゴヌクレオチド-介在性突然変異誘発  
オリゴヌクレオチド-指向性突然変異誘発は本発明の置換変異体を製造するための好ましい方法である。また、それを用いて本発明の欠失および挿入変異体を都合よく製造することができる。この方法はAdelmanら〔DNA, 2:183 (1983)〕により開示されているように当分野で周知である。

【0095】

通常、少なくとも25ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを用いてt-P A分子中の2またはそれ以上のヌクレオチドを挿入、欠失または置換する。最適のオリゴヌクレオチドは、突然変異をコードしているヌクレオチドの両側に完全に対合する12~15のヌクレオチドを有するであろう。これによりオリゴヌクレオチドが一本鎖DNA鋳型分子に正しくハイブリダイズすることが確実になる。該オリゴヌクレオチドは、例えばCreaら〔Proc. Nat'l. Acad. Sci, USA, 75:5765 (1978)〕により開示されているように当分野で周知の方法を用いて容易に合成される。

【0096】

DNA鋳型分子は、野生型のcDNA t-P A挿入物を有するベクターの一本鎖の形態である。一本鎖鋳型は、バクテリオファージM13ベクター(市販品として入手可能なM13 mp18およびM13 mp19ベクターが適当である)またはVeiraら〔Meth. Enzymol., 153:3 (1987)〕により開示されている一本鎖ファージ複製起点を含有するベクターのどちらかから得られるベクターによってのみ生成させることができる。従って、一本鎖の鋳型を得るために、突然変異を起こすべきcDNA t-P Aをこれらのベクターの1つに挿入しなければならない。一本鎖鋳型の製造はSambrookら(上記)のセクション4.21~4.41に開示されている。

【0097】

天然のセレクトリリガンド配列に突然変異を起こさせるために、適当なハイブリダイゼーション条件下でオリゴヌクレオチドを一本鎖DNA鋳型分子にアニーリングさせる。次いでDNA重合酵素、通常はE. coli DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントを添加する。この酵素はオリゴヌクレオチドをプライマーとして利用して突然変異含有DNA鎖の合成を完了させる。ゆえに、一方のDNA鎖がベクター中に挿入された天然のセレクトリリガンドをコードし、第二のDNA鎖が同じベクター中に挿入されたセレクトリリガンドの突然変異形をコードするようにヘテロ二本鎖分子が形成される。次いで、このヘテロ二本鎖を適当な宿主細胞、通常はE. coli JM101などの原核生物中に導入する。細胞を増殖させた後に、アガロースプレート上にプレートし、<sup>32</sup>Pで放射ラベルされたオリゴヌクレオチドプライマーを用いてスクリーニングしてタンパク質コア内において突然変異したセレクトリリガンドを含有するコロニーを同定する。これらのコロニーを選択し、DNAを配列決定して、分子のタンパク質コア中の突然変異の存在を確認する。

【0098】

1を越えるアミノ酸が置換された突然変異体をいくつかの方法のうちの1つで得ることができる。アミノ酸がポリペプチド鎖中において共に近接して位置しているなら、所望のアミノ酸置換の全てをコードする1個のオリゴヌクレオチドを用いて同時に突然変異させることができる。しかし、アミノ酸が互いに距離を置いて位置している(例えば、10を越えるアミノ酸により分離されている)なら、全ての所望の変化をコードする1個のオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを得ることは比較的困難である。その代わりに、2つの別法のうちの1つを用いることができる。第一の方法においては、置換すべき各アミノ酸に対して別のオリゴヌクレオチドを生成させる。次いでそのオリゴヌクレオチドを一本鎖鋳型DNAに同時にアニーリングさせると、その鋳型から合成された第二のDNA鎖は全ての所望のアミノ酸置換をコードするであろう。もう一つの方法は、所望の突然変異体を製造するために2またはそれ以上の突然変異誘発の繰り返すことからなる。初回は1個の突然変異について述べたものと同様である：天然のセレクトリガンドのタンパク質コアをコードしているDNAを鋳型として用い、最初の所望のアミノ酸置換コードしているオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニーリングさせ、次いでヘテロ二本鎖DNA分子を得る。二回目の突然変異誘発は初回の突然変異誘発において製造された突然変異されたDNAを鋳型として用いる。ゆえに、この鋳型はすでに1またはそれ以上の突然変異を含んでいる。次いで、別の所望のアミノ酸置換をコードしているオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニーリングさせると、この時に得られるDNA鎖は初回および二回目の突然変異誘発の両方から生じた突然変異をコードしている。この得られたDNAを第三回目以降の突然変異誘発における鋳型として用いることができる。

10

### 【0099】

#### 3. PCR突然変異誘発

さらにPCR突然変異誘発が本発明のセレクトリガンドのアミノ酸変異体を製造するのに適している。以下の記載はDNAについて示すものであるが、本法はRNAにも適用できることは理解される場所である。通常PCR法とは以下の方法を意味する。PCRにおいて少量の鋳型DNAを出発物質として用いる場合には、鋳型DNA中の対応する領域とは配列が若干異なるプライマーを用いて、プライマーが鋳型と異なっている位置でのみ鋳型配列と異なる比較的大量の特異的なDNAフラグメントを得ることができる。突然変異をプラスミドDNA中に導入するために、プライマーのうちの1つを突然変異の位置と重なりかつその突然変異を含むように設計する。他のプライマーの配列はプラスミドの対立鎖の配列の一部と同一でなければならないが、この配列はプラスミドDNAに沿った任意の場所に位置させることができる。しかし、最終的にプライマーにより囲まれたDNAの全増幅領域を容易に配列決定し得るように、その第二のプライマーの配列は第一の配列から200ヌクレオチド以内に位置させるのが好ましい。上記の様にプライマー対を用いるPCR増幅により、プライマーにより指定された突然変異の位置において、また、鋳型のコピーはいくらか誤る傾向があるので他の位置において異なるDNAフラグメントの一群が得られる。

20

30

### 【0100】

生成物質に対する鋳型の比率が非常に低いならば、生成物DNAフラグメントの大部分が所望の突然変異を含む。この生成物質を用いて通常のDNA法によりPCR鋳型として働いたプラスミド中の対応する領域を置き換える。別々の位置における突然変異は、突然変異体である第二のプライマーを用いるか、または異なる変異体プライマーを用いて二回目のPCRを行って2つの得られたPCRフラグメントを3部分（またはそれ以上）連結においてベクターフラグメントに同時に連結することにより同時に導入することができる。

### 【0101】

#### C. 複製可能なベクターへのDNAの挿入

本発明の（天然または変異体）セレクトリガンドをコードしているcDNAまたはゲノムDNAを、さらにクローニングまたは発現を行うために複製可能なベクターに挿入する。多くのベクターが利用可能であり、適当なベクターの選択は、1) DNA増幅（クローニング）に用いるのかまたは発現のために用いるのか、2) ベクターに挿入すべきDNAのサイズ、3) ベクターにより形質転換すべき宿主細胞に依存するであろう。各々のベクターは、その機能および適合性である宿主細胞に依存する様々な成分を含む。通常のベクター成分には、以下に示す1またはそれ以上の成分が含まれるがそれらに限定はされない：シグナル配列、複製起点、1またはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー成分、プロモーターおよび転写終結配列。特定のベクターを、適合性である宿主細胞と合わせて以

40

50

下に記載する。

【0102】

標準的な組換えDNA法を用いて加工なベクターを製造する。単離されたプラスミドおよびDNAフラグメントを切断、加工し、特定の順序で共に連結して所望のベクターを得る。

【0103】

適当な緩衝液中で適当な制限酵素または酵素群を用いてDNAを切断する。通常、約20  $\mu$ lの緩衝溶液中で約1~2単位の適当な制限酵素と共に約0.2~1  $\mu$ gのプラスミドまたはDNAフラグメントを使用する(適当な緩衝液、DNA濃度、およびインキュベーション時間および温度は制限酵素の製造者により特定されている)。通常、インキュベーション時間は37 で約1または2時間で十分であるが、いくつかの酵素はもっと高い温度を必要とする。インキュベーション後に、フェノールおよびクロロホルムの混合液で消化溶液を抽出することにより酵素および他の混入物質を除去し、エタノール沈殿によりDNAを水性分画から回収する。

10

【0104】

DNAフラグメントを共に連結して機能性ベクターを得るために、DNAフラグメントの末端を互いに適合性にしなければならない。いくつかの場合において、該末端はエンドヌクレアーゼ消化の後に直接適合性であろう。しかし、通常はエンドヌクレアーゼ消化により得られる付着末端を最初に変換して平滑末端として連結のために適合性のものとする必要がある。末端を平滑化するために、該DNAを適当な緩衝液中、15 で少なくとも15分間、4つのデオキシヌクレオチド三リン酸の存在下に10単位のDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント(Klenow)で処理する。次いでフェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製する。

20

【0105】

DNAゲル電気泳動を用いて、切断されたDNAフラグメントをサイズ-分離して選択することができる。該DNAをアガロースまたはポリアクリルアミドマトリックスのどちらかの中で電気泳動することができる。マトリックスの選択は分離すべきDNAフラグメントのサイズに依存するであろう。Sambrookら(上記)のセクション6.30~6.33に開示されているように、電気泳動後に、該DNAをマトリックスから電気溶離により抽出するか、または、低-融解アガロースをマトリックスとして用いた場合には、アガロースを融解させてそれからDNAを抽出する。

30

【0106】

共に連結すべきDNAフラグメント(連結すべき各フラグメントの末端が適合性となるよう適当な制限酵素で予め消化されている)を溶液中において約等モル量で存在させる。また該溶液はATP、リガーゼ緩衝液およびT4DNAリガーゼなどのリガーゼをDNA0.5  $\mu$ g当たり約10単位で含むであろう。DNAフラグメントをベクターに連結しようとするときには、該ベクターを最初に適当な制限エンドヌクレアーゼで切断することにより線状にし、次いで細菌性アルカリホスファターゼまたは子ウシ腸アルカリホスファターゼのどちらかでホスファターゼ処理する。これにより連結工程中のベクターの自己-連結を防ぐ。

40

【0107】

連結後、挿入された外来遺伝子を含むベクターを適当な宿主細胞中に導入する。形質転換された細胞を抗生物質、通常はテトラサイクリン(tet)またはアンピシリン(amp)上での増殖により選択するが、該細胞はそれらに対してベクター上のtetおよび/またはamp耐性遺伝子の存在のために耐性となっている。連結混合物が真核性宿主細胞に導入されたときには、形質転換された細胞を上記のDHFR/MTX系により選択することができる。形質転換された細胞を培養増殖させ、次いでプラスミドDNA(プラスミドは所望の外来遺伝子に連結されたベクターを意味する)を単離する。次いでこのプラスミドDNAを制限酵素地図作成および/またはDNA配列決定により分析する。DNA配列決定は、通常、Messingらの方法[Nucleic Acids Res., 9:309 (1981)]またはMaxamらの方法[Method

50

s of Enzymology, 65:499 (1980)〕のどちらかにより行う。

【 0 1 0 8 】

D . 宿主細胞の選択および形質転換

本発明の糖タンパク質リガンドの炭水化物成分は、レセプターの認識およびレセプター結合にとって必須である。従って、タンパク質をグリコシル化された形態で発現する真核宿主細胞が本発明のリガンドの発現のために好ましい。しかし、タンパク質をグリコシル化しない原核生物、例えばE. coliにおける発現もまた実行可能である。非グリコシル化タンパク質を後に例えば以下に詳述する化学的および/または酵素的な方法によりグリコシル化することができる。

【 0 1 0 9 】

1 . 真核多細胞生物

多細胞生物は本発明を実施するための宿主として好ましい。無脊椎動物および脊椎動物細胞両方の培養が許容できるが、脊椎動物細胞の培養、とりわけ哺乳動物の培養が好ましい。適当なセルラインの例には、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651) ; ヒト胎児腎臓株293S [Grahamら, J. Gen. Virol., 36:59 (1977)] ; ペビーハムスター腎臓細胞(BHK, ATCC CCL 10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞[UrlabおよびChasin, Proc .Natl. Acad. Sci USA, 77:4216 (1980)] ; マウスセルトリ細胞[TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243 (1980)] ; サル腎臓細胞(CV1-76, ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2) ; イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CR; 1442) ; ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065) ; マウス乳腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51) ; ラット肝癌細胞[HTC, MI. 54, Baumannら, J. Cell Biol., 85:1 (1980)] ; およびTRI細胞[Matherら, Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44 (1982)]が含まれる。これらの細胞の発現ベクターには、通常(もし必要ならば)、複製起点、発現すべき遺伝子の前に位置するプロモーター、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結部位のためのDNA配列が含まれる。

【 0 1 1 0 】

哺乳動物の発現ベクターにおいて用いられるプロモーターはウイルス起源であることが多い。これらのウイルス性プロモーターは通常ポリオマウイルス、アデノウイルス2由来であり、シミアン・ウイルス40(SV40)であることが最も多い。SV40ウイルスは初期および後期プロモーターと称される2つのプロモーターを含む。これらの両プロモーターは、ウイルスの複製起点をも有する1つのDNAフラグメントとしてウイルスから容易に得られるから特に有用である[Fiersら, Nature, 273:113 (1978)]。また、HindIII部位からウイルス複製起点中のBglI部位へと伸長する約250bpの配列を含むならば、より小さいまたはより大きいSV40DNAフラグメントを用いることができる。

【 0 1 1 1 】

別法では、外来遺伝子と天然に結合されているプロモーター(相同なプロモーター)を、形質転換のために選択した宿主セルラインと適合性である場合に用いることができる。

【 0 1 1 2 】

複製起点を外性の供給源、例えばSV40または他のウイルス(例えばポリオマ、アデノ、VSV、BPV)から得てクローニングベクターに挿入することができる。別法では、複製起点を宿主細胞染色体複製機構から得ることができる。外来遺伝子を含むベクターを宿主細胞染色体中に組込むときには、後者が十分であることが多い。

【 0 1 1 3 】

十分な量のセレクチンリガンドを形質転換された細胞培養物から製造することができる。しかし、第二のDNAコード化配列の使用により産生レベルを増すことができる。第二のコード化配列は通常、酵素ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)を含む。通常、野生型の形態のDHFRは化学物質メトトレキセート(MTX)により阻害される。細胞中のDHFR発現のレベルは培養宿主細胞に添加されたMTXの量に依存して変化するであろう

10

20

30

40

50

。D H F Rを第二配列として特に有用なものにする別の特徴は、これが形質転換された細胞を同定するための選択マーカーとして使用し得ることである。

【 0 1 1 4 】

D H F Rの2つの形態が第二の配列としての使用のために利用可能であり、それらは野生型D H F RおよびM T X一耐性D H F Rである。特定の宿主細胞中で用いられるD H F Rの型は、宿主細胞がD H F R欠失であるか否か（それが非常に低いレベルのD H F Rを内性的に産生するか、または機能的なD H F Rを全く産生しないか）に依存する。D H F R - 欠失セルライン、例えばUrlaubおよびChasin [Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216 (1980)] により開示されているC H Oセルラインを野生型D H F Rコード化配列で形質転換する。形質転換後に、これらのD H F R欠失セルラインは機能的D H F Rを発現し、栄養分ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを欠く培養培地中で増殖させることができる。非形質転換細胞はこの培地中では生存しないであろう。

10

【 0 1 1 5 】

D H F RのM T X - 耐性型は、M T X感受性の機能的D H F Rの正常量を内性的に生産する宿主細胞において、形質転換された宿主細胞を選択する手段として用いることができる。C H O - K 1セルライン (A T C C 番号C L 6 1) はこれらの特徴を有しており、ゆえにこの目的のための有用なセルラインである。M T Xの細胞培養培地への添加により、M T X一耐性D H F RをコードしているD N Aで形質転換された細胞のみの増殖が可能となるであろう。非形質転換細胞はこの培地中で生存することができないであろう。

【 0 1 1 6 】

本発明の変異体を製造するために用いられる哺乳動物の宿主細胞を種々の培地中で培養することができる。市販品として入手可能な培地、例えばHam's F 1 0 (Sigma)、最少必須培地 ([ M E M ], Sigma)、P R M I - 1 6 4 0 (Sigma)、およびダルベッコの改良イーグル培地 ([ D M E M ], Sigma) は宿主細胞の培養に相当である。これらの任意の培地には必要に応じてホルモンおよび/または他の増殖因子 (インスリン、トランフェリンまたは上皮増殖因子等)、塩 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩等)、緩衝液 (H E P E S等)、ヌクレオシド (アデノシンおよびチミジン等)、抗生物質 (ゲンタマイシン等)、微量元素 (通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機成分として定義される)、およびグルコースまたは同等のエネルギー源を追加することができる。また、他のあらゆる必要な追加物を当業者に既知の適当な濃度で含有させること

20

30

【 0 1 1 7 】

2 . 真核微生物

多細胞性真核生物に加えて、真核微生物、例えば糸状菌または酵母が本発明の実施に適している。Saccharomyces cerevisiaeまたは通常のパン酵母が下等真核宿主微生物の中で最も一般的に用いられる。しかし、他の数多くの属、種および株が一般に入手可能であり、本発明において有用である。これらは、例えば、Schizosaccharomyces pombe [BeachおよびNurse, Nature, 290:140 (1981); EP139, 383 (1985年5月2日発行)]; Kluyveromyces宿主 (米国4, 943, 529; Fleerら, 上記)、例えば、K. lactis [MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourtら, J. Bacteriol., 737 (1983)]; K. fragilis (ATCC 12, 42 4)、K. bulgaricus (ATCC 16, 045)、K. wickeramii (ATCC 24, 178); K. waltii (ATCC 56, 500)、K. drosophilae (ATCC 36, 906; VandenBergら, 上記)、K. thermotolerans、およびK. marxianus; yarrowia [EP 402, 226]; Pichiapastoris [EP 183, 070; Sreekrishnaら, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 (1988)]; Candida; Trichoderma reesei [EP 244, 234]; Neurospora crassa [Caseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259 (1979)]; Schwanniomyces、例えばSchwanniomyces occidentalis [EP 394, 538 (1990年10月31日発行)]; および糸状菌、例えばNeurospora、Penicillium、Tolypocladium [WO 91/00357 (1991年1月10日発行)]; およびAspergillus宿主、例えばA. nidulans [Ballanceら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284 (1983); Tilburnら, Gene, 26:205 (1983); Yeltonら, Proc. Natl. Acad. Sci. US

40

50

A, 81:1470 (1984) ] および *A.niger* [ Kelly および Hynes, *EMBO J.*, 4:475 (1985) ] である。酵母ベクターにおける適当な促進配列には、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ [ Hitzeman ら, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980) ] または他の解糖酵素 [ Hess ら, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968) ; Holland ら, *Biochemistry*, 17:4900(1978) ]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸脱炭酸酵素、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼに対するプロモーターが含まれる。適当な発現プラスミドの構築において、さらにこれらの遺伝子と結合されている終止配列を、発現が所望である配列の 3' で発現ベクターに連結させて mRNA のポリアデニル化および終止をもたらす。増殖条件により転写が制御される付加的な利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトロム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、および上記のグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素に対するプロモーター領域である。酵母 - 適合性プロモーター、複製起点および終止配列を含有しているあらゆるプラスミドベクターが適当である。

#### 【 0 1 1 8 】

##### 3 . 原核細胞

原核生物は特に大量の DNA の迅速な製造のために、部位指向性突然変異誘発のために用いられる一本鎖 DNA 鋳型の製造のために、多くの突然変異体を同時にスクリーニングするために、および得られた突然変異体の DNA 配列決定のために有用である。適当な原核宿主細胞には、*E. coli* K 1 2 株 2 9 4 ( ATCC 番号 31,446 )、*E. coli* 株 W 3 1 1 0 ( ATCC 番号 27,325 )、*E. coli* X 1 7 7 6 ( ATCC 番号 31,537 )、および *E. coli* B が含まれる。しかし、他の多くの *E. coli* 株、例えば H B 1 0 1、J M 1 0 1、N M 5 2 2、N M 5 3 8、N M 5 3 9、および他の多くの原核生物の種および属も同様に用いることができる。

#### 【 0 1 1 9 】

また、原核生物は DNA 配列発現のための宿主として用いることができる。上に列記した *E. coli* 株、*Bacillus subtilis* 等の bacilli、他の腸内細菌科例えば *Salmonella typhimurium* または *Serratia marcescens*、および種々の *Pseudomonas* 種の全てを宿主として用いることができる。

#### 【 0 1 2 0 】

宿主細胞と適合性の種から得たレプリコンおよび制御配列を含有しているプラスミドベクターをこれらの宿主と共に用いる。該ベクターは通常、複製部位、形質転換された細胞において表現型選択をもたらすマーカー遺伝子、1 またはそれ以上のプロモーター、および外来 DNA の挿入のためのいくつかの制限部位を含有しているポリリンカー領域を有する。*E. coli* の形質転換のために通常用いられるプラスミドには pBR 3 2 2、pUC 1 8、pUC 1 9、pUC 1 1 8、pUC 1 1 9 および Bluescript M 1 3 が含まれるが、これらの全ては Sambrook ら ( 上記 ) のセクション 1 . 1 2 ~ 1 . 2 0 中に開示されている。しかし、他の多くの適当なベクターも利用可能である。これらのベクターはアンピシリンおよび / またはテトラサイクリン耐性をコードしている遺伝子を含み、この耐性によりこれらのベクターで形質転換された細胞のこれらの抗生物質存在下での増殖が可能になる。

#### 【 0 1 2 1 】

原核性ベクターにおいて最も一般的に用いられるプロモーターには、 $\lambda$  - ラクタマーゼ ( ベニシリナーゼ ) およびラクトースプロモーター系 [ Chang ら *Nature*, 375:615 (1978) ; Itakura ら, *Science*, 198:1056 (1977) ; Goeddel ら, *Nature*, 281:544 (1979) ] およびトリプトファン ( trp ) プロモーター系 [ Goeddel ら, *Nucl. Acids Res.*, 8:4057 (1980) ; EP 0 Appl. Publ. No. 36, 776 ]、およびアルカリホスファターゼ系が含まれる。これらが最も一般的に用いられるが、他の微生物のプロモーターも用いられており、それらのヌクレオチド配列に関する詳細は公開されているので、当業者はそれらをプラスミドベクター

10

20

30

40

50

中に機能的に連結することが可能である〔Siebenlistら, Cell, 20:269 (1980)を参照〕。

【 0 1 2 2 】

4 . 分泌系

細胞から通常分泌される多くの真核性タンパク質は、内因性のシグナル配列をアミノ酸配列の一部として含む。この配列は、タンパク質を小胞体およびゴルジ装置を経て細胞から輸出させることを目的とする。シグナル配列は通常タンパク質のアミノ末端に位置しており、約13から約36アミノ酸の範囲の長さである。実際の配列はタンパク質間で異なるが、全ての既知の真核性シグナル配列は少なくとも1の正荷電された残基および10～15アミノ酸の疎水性の高い部分（通常ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリンおよびフェニルアラニンのアミノ酸に富む）をシグナル配列の中央付近に含む。シグナル配列はタンパク質の分泌された形態には通常存在しないが、これはシグナル配列がタンパク質の小胞体中への移動の間に小胞体上に位置するシグナルペプチダーゼにより切断されるからである。シグナル配列がまだ結合しているタンパク質は、「プレ-タンパク質」またはタンパク質の未成熟形と称されることが多い。

10

【 0 1 2 3 】

しかし、全ての分泌型タンパク質が切断されるアミノ末端シグナル配列を含むわけではない。いくつかのタンパク質、例えばオボアルブミンはタンパク質の内部領域に位置するシグナル配列を含む。この配列は移動中に通常切断されない。

【 0 1 2 4 】

シグナル配列をタンパク質に結合させることにより、通常細胞質中に見られるタンパク質を分泌の対象とすることができる。これはシグナル配列をコードしているDNAをタンパク質をコードしているDNAの5'末端に連結させて、次いでこの融合タンパク質を適当な宿主細胞中で発現させることにより容易に行われる。シグナル配列を有するタンパク質をコードしている任意の遺伝子由来の制限フラグメントとしてシグナル配列をコードしているDNAを得ることができる。ゆえに、原核生物、酵母および真核生物のシグナル配列を、本発明を実施するために使用される宿主細胞の型に応じて本発明において用いることができる。遺伝子のシグナル配列部分をコードしているDNAを適当な制限エンドヌクレアーゼを用いて切除し、次いで分泌させるべきタンパク質をコードしているDNAに連結する。

20

【 0 1 2 5 】

機能的なシグナル配列の選択には、シグナル配列の切断およびタンパク質の分泌が起こるようにシグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼにより認識されることが必要とされる。いくつかの真核生物遺伝子、例えばヒト成長ホルモン、プロインスリンおよびプロアルブミンのシグナル配列部分をコードしているDNAおよびアミノ酸配列は既知であり〔Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York (1988), p. 769を参照〕、適当な真核宿主細胞中でシグナル配列として用いることができる。例えば酸性ホスファターゼ〔Arimaら, Nuc. Acids Res., 11:1657 (1983)〕、 $\sigma$ -因子、アルカリホスファターゼおよびインベルターゼなどの酵母シグナル配列を用いて酵母宿主細胞からの分泌を指令することができる。例えばLamBまたはOmpF〔Wongら, Gene 68:193 (1988)〕、MalE、PhoAまたは $\lambda$ -ラクターゼをコードしている遺伝子ならびに他の遺伝子から得た原核生物のシグナル配列を用いて、タンパク質を原核細胞から培養培地中に向けることができる。

30

40

【 0 1 2 6 】

分泌されるようにシグナル配列を含有する所望のタンパク質を得るための別の方法は、シグナル配列をコードしているDNAを化学的に合成するものである。この方法では、選択されたシグナル配列をコードしているオリゴヌクレオチドの両方の鎖を化学的に合成し、次いで互いにアニーリングさせて二本鎖を形成させる。次いでこの二本鎖オリゴヌクレオチドをタンパク質をコードしているDNAの5'末端に連結させる。

【 0 1 2 7 】

50

次いでタンパク質をコードしているDNAをそれに連結されたシグナル配列と共に含有している構築物を適当な発現ベクターに連結させることができる。この発現ベクターを適当な宿主細胞中に導入して所望のタンパク質を発現させて分泌させる。

#### 【0128】

##### E. 形質転換法

哺乳動物の宿主細胞および固い細胞膜障壁を有していない他の宿主細胞の培養物は通常、GrahamおよびVan der Eb〔Virology, 52:546 (1978)〕により初めに開示されSambrookら(上記)のセクション16.32~16.37に開示されたように修正されたリン酸カルシウム法を用いて形質転換させる。しかし、細胞中にDNAを導入するための他の方法、例えばポリブレン〔KawaiおよびNishizawa, Mol. Gen. Biol., 4:1172 (1984)〕、プロトプラスト融合法〔Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2163 (1980)〕、電気穿孔法〔Newmannら, EMBO J., 1:841 (1982)〕、および核への直接マイクロインジェクション〔Capecchi, Cell, 22:479 (1980)〕を用いてもよい。

10

#### 【0129】

酵母宿主細胞は通常、Hinnen〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929 (1978)〕が開示しているようにポリエチレングリコール法を用いて形質転換させる。

#### 【0130】

##### F. 宿主細胞の培養

本発明のセレクチンリガンドを製造するために用いられる哺乳動物宿主細胞は様々な培地中で培養することができる。市販品として入手可能な培地、例えばハムのF10 (Sigma)、最少必須培地(MEM、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、またはダルベッコの改良イーグル培地(DMEM、Sigma)がそのような宿主細胞を培養するのに適当である。さらに、HamおよびWallace, Meth. Enz. 58, 44(1979); BarnesおよびSato, Anal. Biochem. 102, 255 (1980); 米国特許番号4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; または4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195; 米国特許Re. 30,985に開示されているいずれかの培地を宿主細胞のための培養培地として用いることができる。これら全ての培地には必要に応じてホルモンおよび/または他の増殖因子(例えばインスリン、トランフェリン、および/または上皮増殖因子)、塩(例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩)、緩衝剤(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシンおよびチミジン)、抗生物質(例えばゲンタマイシン<sup>TM</sup>)、微量元素(通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物)、およびグルコースまたは同等のエネルギー源を追加することができる。さらに他のいずれかの必要な追加物質を、当業者に既知であろう適当な濃度で含有させることができる。培養条件、例えば温度、pH等は発現用に選択した宿主細胞について既に用いられている条件であり、当業者には明白であろう。

20

30

#### 【0131】

##### G. グリコシル化変異体

ポリペプチドのグリコシル化は通常N-結合性またはO-結合性のどちらかである。N-結合性とはアスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン(式中、Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である)がアスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的な結合のための認識配列である。O-結合性グリコシル化はN-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの糖のうちの1つのヒドロキシアミノ酸への結合を意味し、このアミノ酸は通常セリンまたはトレオニンであることがほとんどであるが5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもO-結合性グリコシル化に関与することができる。

40

#### 【0132】

本発明のセレクチンリガンドは優勢なO-結合性グリコシル化部位を特徴とする。これらは、例えば該リガンドのアミノ酸配列への1またはそれ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加またはこれらによる置換により修飾することができる。容易にするために、改変は基本的にアミノ酸配列変異体について上述した方法を用いてDNAレベルでなされるのが普通である。

50

## 【0133】

また、本発明のリガンドへのグリコシドの化学的または酵素的な結合を用いて炭水化物置換基の数または特性を修飾または増大させることができる。これらの方法はO-結合性（またはN-結合性）のグリコシル化を行い得るポリペプチドの生成を必要としない点において有利である。用いられる結合様式により、糖を（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）遊離ヒドロキシル基、例えばシステインの遊離基、（d）遊離スルフヒドリル基、例えばセリン、トレオニンまたはヒドロキシプロリンの遊離基、（e）芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの残基、または（f）グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法はW0 87/0 5330（1987年9月11日発行）ならびにAplinおよびWriston〔CRC Crit. Rev. Biochem. em., PP. 259-306（1981）〕に開示されている。

10

## 【0134】

また、セレクトインリガンド上に存在する炭水化物部分を化学的または酵素的に除去することができる。化学的な脱グリコシル化はトリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物への暴露を必要とする。この処理により、結合している糖を除く大部分または全部の糖の切断の結果が得られ、ポリペプチドは無傷のまま残る。化学的な脱グリコシル化はHakimuddinら〔Arch. Biochem. Biophys. 259, 52（1987）〕およびEdgeら〔Anal. Biochem. 118, 131（1981）〕により開示されている。Thotakuraら〔Meth. Enzymol. 138, 350（1987）〕により開示されているように様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼにより炭水化物部分を除去することができる。グリコシル化はDuskinら〔J. Biol. Chem. 257, 3105（1982）〕により開示されているようにツニカマイシンにより抑制することができる。ツニカマイシンはタンパク質-N-グリコシダーゼ結合の形成をブロックする。

20

## 【0135】

また、適当な宿主細胞を選択することにより本発明のセレクトインリガンドのグリコシル化変異体を製造することができる。酵母は、例えば哺乳動物系のものとは大きく異なるグリコシル化を導く。同様に、セレクトインリガンドの供給源とは異なる種（例えばハムスター、ネズミ、昆虫、ブタ、ウシまたはヒツジ）または組織（例えば肺、肝臓、リンパ球、間葉、上皮）に由来する哺乳動物細胞を、異なるグリコシル化（例えば高レベルのマンノースまたは異なる比率のマンノース、フコース、シアル酸およびセレクトイン結合に必須の他の糖により特徴付けられる）を導く能力について常法によりスクリーニングする。

30

## 【0136】

## H. 共有結合修飾

天然に存在するセレクトインリガンド分子または該分子と共通する生物学的性質を有している配列の共有結合修飾は本発明の範囲内に含まれる。このような修飾は、セレクトインリガンドタンパク質の標的化アミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応し得る有機誘導化剤と反応させることにより、または選択された組換え宿主細胞において機能する翻訳後修飾の機構を利用することにより誘導されるのが普通である。得られた共有結合誘導体は生物学的活性のために重要な残基の同定を目的とするプログラムにおいて有用であり、セレクトインリガンドのイムノアッセイのために、または組換え糖タンパク質のイムノアフィニティー精製のための抗-セレクトインリガンド抗体の製造のために有用である。例えば、ニンヒドリンとの反応後のタンパク質の生物学的活性の完全な不活性化は、少なくとも1個のアルギニルまたはリシル残基がその活性に必須であることを示すものであり、その後、選択された条件下で修飾された個々の残基を修飾されたアミノ酸残基を含むペプチドフラグメントの単離により同定する。そのような修飾は当分野での通常の技術範囲内にあり、多くの実験を行うことなく実施される。

40

## 【0137】

二官能性物質による誘導化は、セレクトインリガンド糖タンパク質とポリペプチドとの分子内集合体を製造するために、ならびにセレクトインリガンド糖タンパク質をアッセイまたはアフィニティー精製において使用するための水不溶性支持体マトリックスまたは表面に架橋するために有用である。さらに、鎖間架橋の研究により高次構造に関する直接的な情報

50

が得られるであろう。通常用いられる架橋剤には 1, 1 - ビス(ジアゾアセチル) - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ二価性イミドエステルおよび二価性マレイミドが含まれる。メチル - 3 - [(P - アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデート等の誘導化剤により、光の存在下で架橋を形成し得る光による活性化が可能な中間体得られる。別法では、臭化シアン活性化炭水化物などの反応性の水不溶性マトリックスおよび米国特許番号3, 959, 642; 3, 969, 287; 3, 691, 016; 4, 195, 128; 4, 247, 642; 4, 229, 537; 4, 055, 635; および4, 330, 440に開示されている系反応性基質をタンパク質の固定化および架橋に用いる。

#### 【0138】

ある種の翻訳後修飾が、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果生じる。グルタミンおよびアスパリギン残基は翻訳後に脱アミド化されて対応するグルタミンおよびアスパルチル残基となることが多い。別法では、これらの残基を穏やかな酸性条件下で脱アミド化する。これらの残基のどちらの形態も本発明の範囲内にある。

10

#### 【0139】

他の翻訳後修飾にはプロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化が含まれる〔T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, PP. 79-86 (1983)〕。

#### 【0140】

他の誘導体は非タンパク質性ポリマーに共有結合させた本発明の新規なペプチドからなる。通常この非タンパク質性ポリマーは親水性合成ポリマー、すなわち天然には見いだされないポリマーである。しかし、天然に存在して組換えまたはインビトロ法により製造されるポリマーは、天然から単離されるポリマーであるから有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドン本発明の範囲内にある。特に有用なポリマーはポリビニルアルキレンエーテル、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールである。

20

#### 【0141】

セレクトリリガンドを様々な非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンに米国特許番号4, 640, 835; 4, 496, 689; 4, 301, 144; 4, 670, 417; 4, 791, 192または4, 179, 337に示されている方法で結合させることができる。

30

#### 【0142】

セレクトリリガンドを、例えばコアセルベーション法または界面ポリマー化により製造されたマイクロカプセル中、コロイド状薬物供給システム(例えば、リボソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ - 粒子およびナノカプセル)中、またはマクロエマルジョン中に捕捉することができる。このような方法はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, Osol, A., 編(1980)に開示されている。

#### 【0143】

I. セレクトリリガンドと安定な血漿タンパク質のキメラ

セレクトリリガンド配列を上定義した安定な血漿タンパク質配列に結合することができる。安定な血漿タンパク質の配列は、例えば免疫グロブリン定常ドメイン配列であってよい。得られる分子は通常セレクトリリガンド - 免疫グロブリンキメラと称される。

40

#### 【0144】

好ましい態様においては、セレクトリリガンドに対する結合部位を含む配列のC末端を免疫グロブリン(例えば免疫グロブリンG<sub>1</sub>)のエフェクター機能を有している抗体のC末端部分(具体的にはFcドメイン)のN末端に融合させる。全重鎖定常領域をセレクトリリガンド結合部位を含有している配列に融合させることが可能である。しかし、より好ましくは、パパイニン切断部位のすぐ上流のヒンジ領域(これはIgG Fcを化学的に定義するものであり; 重鎖定常領域の最初の残基を114としたときの残基216〔Kobetら, 上記〕、または他の免疫グロブリンの類似の部位)を起点とする配列をこの融合において用いる。特に好ま

50

しい態様においては、セレクチン結合部位を含有しているアミノ酸配列を、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>またはI g G<sub>3</sub>重鎖のヒンジ領域およびC<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3またはC<sub>H</sub>1、ヒンジ、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3ドメインに融合させる。融合がなされる正確な部位は重要ではなく、最適部位は通常の実験により決定することができる。

【0145】

J. セレクチンリガンドの精製

セレクチンリガンドは組換え細胞培養物から既知の方法、例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーにより回収および精製することができる。本発明の範囲内にある他の既知の精製法は抗-セレクチンリガンド抗体を用いた逆層HPLCクロマトグラフィーを利用するものであり、これは本発明のリガンドの精製に有用である。

10

【0146】

特にL-セレクチンリガンドの精製のために開発されたとりわけ有利な精製法を実施例1に記載する。この方法は、組換え法により製造された独特のセレクチンレセプター-免疫グロブリンキメラ(L-セレクチン-IgGと称する)を利用するものであり、この方法により対応する(スルフェート-ラベル化)リガンドを沈殿させることができる。

【0147】

K. 治療用組成物

本発明のセレクチンリガンドを用いて対応するセレクチンレセプターの天然リガンドに対する結合をブロックすることができる。例えばL-セレクチンリガンドは内皮細胞上の天然リガンドに対する循環白血球上のL-セレクチンレセプターの結合を効果的にブロックする。この性質は循環白血球の内皮細胞に対する過剰な結合と関係する徴候または症状、例えば慢性関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症等と関係する炎症を治療するのに有用である。

20

【0148】

本発明のセレクチンリガンドを既知の方法に従い製剤化して薬学的に有用な組成物を製造することができる。これにより該リガンドを薬学的に許容し得る担体と混合する。適当な担体およびその配合は、Remington's Pharmaceutical Sciences [16th ed., 1980, Mack Publishing Co., Osloら編]に開示されている。通常これらの組成物は該リガンドの有効量、例えば約0.5~約10mg/mlの量を、患者に対する効果的な投与に適当な薬学的に許容し得る組成物を製造するための適当な量の担体と共に含むであろう。該リガンドは非経口的に、または有効な形態で血流への放出を確保する他の方法により投与することができる。

30

【0149】

本発明を実施するために用いられる該リガンドの臨床投与に特に適した組成物には、無菌性水溶液または無菌性の水和可能な粉末、例えば凍結乾燥タンパク質が含まれる。薬学的に許容し得る塩の適当量をさらに製剤中に用いて製剤を等張にするのが普通である。

【0150】

本発明の薬学的な組成物の投与方法および所望の薬物濃度は、予定した特定の使用に依存して変化させることができる。

40

【0151】

K. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は実質的に同種の抗体の一群、すなわち少量で存在することがある可能な天然の突然変異体を除いて、その群を構成している個々の抗体が同一である群から得られる。ゆえに、修飾語句「モノクローナル」は別個の抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。

【0152】

例えば本発明のモノクローナル抗体は最初にKohlerおよびMilstein [Nature 256:495 (1975)]により開示されたハイブリドーマ法を用いて作成するかまたは組換えDNA法 [Cab

50

illyら、米国特許番号4, 816, 567)により作成することができる。

【0153】

ハイブリドーマ法においては、マウスまたは他の適当な宿主動物(例えばハムスター)をセレクトインリガンドタンパク質を用いて皮下、腹腔内、または筋肉内経路により免疫し、免疫に用いたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するかまたは産生させるリンパ球を誘導する。別法では、リンパ球をインビトロで免疫することができる。次いで適当な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いてリンパ球を骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を得る〔Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)〕。

【0154】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、非融合の親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1またはそれ以上の物質を好ましくは含む適当な培養培地にまいて増殖させる。例えば、もし親骨髄腫細胞がヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPR TまたはHPR T)酵素を欠失しているなら、ハイブリドーマのための培養培地は通常ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み(HAT培地)、これらの物質がHGPR T-欠失細胞の増殖を妨げる。

【0155】

好ましい骨髄腫細胞は、効率良く融合し、選択された抗体-産生細胞による安定かつ高レベルの抗体の発現を支持し、そしてHAT培地等の培地に感受性の細胞である。これらの中で、好ましい骨髄腫細胞株はネズミ骨髄腫株であり、例えばSalk Institute Cell Distribution Center〔San Diego, California USA〕から入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍に由来する株およびAmerican Type Culture Collection〔Rockville, Maryland USA〕から入手可能なSP-2細胞である。さらに、ヒト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株がヒトモノクローナル抗体の製造に対して開示されている〔Kozbor, J. Immunol.133:3001 (1984), Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Application, PP. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)〕。

【0156】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地をTNFR1に対して指向性のモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素-結合免疫吸収測定法(ELISA)により測定する。

【0157】

対応するリガンドの結合に対するモノクローナル抗体の親和性は、例えばMunson & Pollard〔Anal. Biochem. 107:220 (1980)〕のスキッチャード分析により測定することができる。

【0158】

所望の特異性、親和性、および/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後に、そのクローンを限界希釈法によりサブクローン化して常法により増殖させる。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-104(Academic Press, 1986)。この目的のために適当な培養培地には、例えばダルベッコの改良イーグル培地またはRPMI-1640培地が含まれる。さらに、このハイブリドーマ細胞をインビボで動物の腹水腫瘍として増殖させることができる。

【0159】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体を培養培地、腹水液、または血清から通常の免疫グロブリン精製法、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーにより適当に分離する。

【0160】

本発明のモノクローナル抗体をコードしているDNAは常法を用いて(例えば、ネズミ抗

10

20

30

40

50

体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に単離され配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は該DNAの好ましい供給源として都合がよい。DNAを単離したなら、発現ベクター中に配置することができ、次いでこれを他の状態では免疫グロブリンタンパク質を製造しない宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞中にトランスフェクションして、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を行う。さらに該DNAを、例えばヒト重鎖および軽鎖定常領域に対するコード化配列を相同なネズミ配列の代わりに用いることにより〔Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851 (1984)〕、または免疫グロブリンコード化配列に非-免疫グロブリンポリペプチドに対するコード化配列の全てまたは一部を共有結合させることにより修飾することができ、このようにして、本発明の抗-セレクチンリガンドモノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体を製造する。

10

**【0161】**

通常、このような非-免疫グロブリンポリペプチドを本発明の抗体の定常ドメインの代わりに用いるか、またはそれらを本発明の抗体の1つの抗原-結合部位の可変ドメインの代わりに用いて、セレクチンリガンドに対する特異性を有する1つの抗原-結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう1つの抗原-結合部位からなるキメラの二価の抗体を創製する。

**【0162】**

さらに、キメラまたはハイブリッド抗体は合成タンパク質化学において既知の方法、例えば架橋剤を必要とする方法を用いてインビトロで製造することができる。例えば、ジスルフィド交換反応を用いるかまたはチオエーテル結合を形成させることによりイムノトキシンを構築することができる。この目的のための適当な試薬の例には、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートが含まれる。

20

**【0163】**

診断に応用するために、通常本発明の抗体を検出可能な部分でラベル化する。検出可能な部分は直接的にまたは間接的に検出可能なシグナルを生成し得る任意のものであってよい。例えば、検出可能な部分は放射性同位元素(例えば<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>Sまたは<sup>125</sup>I)、蛍光または化学発光化合物(例えばフルオロセインイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリン);放射性同位元素ラベル(例えば<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>Cまたは<sup>3</sup>H)、または酵素(例えばアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはホースラディシュペルオキシダーゼ)であってよい。

30

**【0164】**

抗体を検出可能な部分に個別に結合させるための当分野で既知のあらゆる方法を用いることができるが、これにはHunterら〔Nature 144:945 (1962)〕;Davidら〔Biochemistry 13:1014 (1974)〕;Painら〔J. Immunol. Meth. 40:219 (1981)〕;およびNygren〔J. Histochem. And Cytochem. 30:407 (1982)〕により開示された方法が含まれる。

**【0165】**

本発明の抗体は既知のアッセイ法、例えば競合的結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイにおいて用いることができる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

40

**【0166】**

競合的結合アッセイは、限定量の抗体との結合に対して試験サンプル分析物(セレクチンリガンド)と競合するラベル化標準(セレクチンリガンドであるかまたはその免疫学的に反応性の部分)の能力に依存する。試験サンプル中のセレクチンリガンド量は抗体に結合される標準の量と逆比例する。結合される標準の量の測定を容易にするために抗体を通常競合の前または後に不溶化するが、これにより抗体に結合された標準および分析物は未結合のままの標準および分析物から簡便に分離することができる。

**【0167】**

サンドイッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々は検出すべきタンパク質の異なる

50

免疫原性の部分、またはエピトープに結合することができる。サンドイッチアッセイにおいては、試験サンプル分析物はまず固体支持体上に固定化された抗体により結合され、その後第二抗体が分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分複合体を形成する(David & Green, 米国特許番号4, 376, 110)。該第二抗体は検出可能な部分でそれ自体ラベルする(直接サンドイッチアッセイ)かまたは検出可能な部分でラベルされた抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定することができる(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型はELISAアッセイであり、この場合の検出可能な部分は酵素である。以下の限定のためのものではない実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0168】

10

##### III. 実施例

実施例1 L-セレクチンにより認識される内皮細胞上の表面糖タンパク質の同定

この実施例により、組換えL-セレクチンが選択的にリンパ節由来の $^{35}\text{S O}_4$ -ラベル化巨大分子に結合することを示す。具体的には、2つの硫酸化、フコシル化およびシアリル化糖タンパク質を同定した。

#### 【0169】

A.  $^{35}\text{S}$ -硫酸塩による器官の代謝ラベル化

腸間膜または末梢(頸部、上腕、腋窩)のリンパ節を8~16週齢の雌性ICRマウスから集めた。Ager [J. Cell Sci., 87:133 (1987)]の方法に従い、リンパ節をカミソリ刃を用いて切断して1mm厚さの薄片とし、この薄片(通常、湿重量0.2g)を2.5mM HEPES、100U/mlペニシリンG、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、および200 $\mu\text{Ci}$ の担体不含の $^{35}\text{S}$ 硫酸ナトリウム(ICN Biochemicals Inc., Costa Mesa, CA)を含有しているRPMI 1640(1ml)中に懸濁した。37 $^{\circ}\text{C}$ で4時間のインキュベーションの後に、この薄片をDulbeccoのリン酸緩衝食塩水(PBS)中でよく洗浄し、次いで氷上においてPotter-Elvehjemホモジナイザーを用いて溶解緩衝液[1mM PMSF、1%(v/v)アプロチニン、10 $\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、0.02% $\text{NaN}_3$ を含むPBS中2%トリトンX-100](1ml)中でホモジナイズした。溶解は震盪器上4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間続けた。溶解物を10,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間遠心分離した。この上清にEDTAを最終濃度2mMで加え、Affi-GelプロテインA(250 $\mu\text{l}$ の圧縮されたビーズ、BioRad Laboratories, Richmond, CA)と共に4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩震盪することにより上清を事前浄化した。

20

30

#### 【0170】

B. L-セレクチン-IgGビーズに吸着された成分の同定

Affi-GelプロテインA(パック化ビーズ10 $\mu\text{l}$ )をL-セレクチン-IgG[W0 91/082 98(1991年6月13日発行)]、CD4-IgG[Caponら, Nature 337:525 (1989)に従い製造]またはヒトIgG(Calbiochem, LaJolla, CA)のいずれか(30 $\mu\text{l}$ )と共にPBS(1ml)中にて4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。このビーズ(L-セレクチン-IgGビーズ、CD4-IgGビーズおよびhuIgG-ビーズと称する)をPBS中で3回および溶解緩衝液で1回洗浄した。CD4-IgGおよびhuIgGビーズを対照として用いた。

40

#### 【0171】

上記セクションAに記載した事前に浄化された溶解物を10,000 $\times\text{g}$ で10秒間遠心分離し、上清に $\text{CaCl}_2$ を最終濃度5mMで加え、この上清を直ちにL-セレクチン-IgGビーズ、CD4-IgGビーズまたはhuIgG-ビーズと混合し(通常パック化ビーズ10 $\mu\text{l}$ 当たり事前浄化された溶解物200 $\mu\text{l}$ )、震盪器上4 $^{\circ}\text{C}$ で4時間インキュベートした。このビーズを溶解緩衝液で6回洗浄し、新しい試験管に移し、溶解緩衝液でもう1回洗浄した。

#### 【0172】

L-セレクチン-IgGビーズに結合した物質をSDS中、2-メルカプトエタノールの存在下で煮沸することにより可溶化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル(9または10

50

% ) 上で電気泳動し、E N T E N S I F Y または E N <sup>3</sup> H A N C E ( N E N ) を用いた蛍光間接撮影法に供した。蛍光間接撮影法により、50 kDの成分はE N <sup>3</sup> H A N C E よりもE N T E N S I F Y を用いて一層拡散する傾向があった。再沈殿実験において、マーカーとしての予め染色された標準 (BioRad、高範囲) と共にS D S - 可溶化サンプルを7.5% S D S ゲル上で電気泳動した。予め染色したオボアルブミン (49.5 kD) を位置マーカーとして用いることによりゲル上の50 kDの回りの領域を切り出し、そのタンパク質を60 mAで一晩、Laemlli溶離緩衝液中に電気溶離 (BioRad model 422) した。溶出液を濃縮し、緩衝液をCentricon 30ユニット (Amicon, Danvers, MA) によりP B S 中の10 mM C A H P S に交換し、次いで上記の様にL - セレクチン - I g G ビーズ、C D 4 - I g G ビーズまたはhuI g G - ビーズと共にインキュベートした。粗溶解物の分析のために、事前浄化された溶解物 (200 μl) を冷アセトン (80% v/v) で沈殿させ、次いで上記の様に電気泳動に供した。

10

## 【0173】

L - セレクチン - I g G ビーズは拡散した50 kD成分 (見かけの分子量範囲は50 kD ~ 58 kD) を [ <sup>35</sup> S ] - 硫酸塩ラベル化腸間膜リンパ節 (M L N) または末梢リンパ節 (P N) から沈殿させた。さらに、約90 kD (83 kD ~ 102 kD) のバンド (硫酸塩導入の点からみて比較的少量) が、ほとんどの分析において観察された。対照の沈殿において、C D 4 - I g G およびhuI g G - ビーズは溶解物中に50 kD主成分または90 kD成分を認識しなかった。粗溶解物を直接分析した場合に、他のいくつかのバンドの中で50 kD成分が主要な構成成分を示した。さらに [ <sup>35</sup> S ] 硫酸塩ラベル化およびL H R I g G での沈殿のための同一の実験法を多くの器官に適用することにより、50 kD成分の組織分布を調べた。リンパ組織の中で、末梢リンパ節および腸間膜リンパ節のみが50 kDおよび90 kDバンドを示し、パイアー斑、脾臓、および胸腺は両方に対して陰性であった。また非 - リンパ器官、例えば腎臓、肝臓、大脳および小脳は完全に陰性であった。

20

## 【0174】

L - セレクチン - I g G ビーズはカルシウムが存在する場合に50 kD成分を沈殿させたが、カルシウム不在の場合には沈殿させなかった。さらに相互作用の特異性をM E L - 14 mAbを用いて調べた。L - セレクチン - I g G ビーズをこの抗体と予めインキュベートすることにより50 kDバンドの該ビーズへの結合は完全にブロックされたが、クラスを一致させた対照の抗体 (抗 - C D 45) では全く効果がなかった。フコイジンはL - セレクチン - I g G ビーズによる50 kD成分の沈殿を完全にブロックしたが、一方で対照の多糖 (コンドロイチン硫酸B、コンドロイチン硫酸A、ケラタン硫酸) は完全に不活性であった。さらに、P P M E の存在は50 kDバンドの強度を顕著に減少させたが、比較的高濃度が必要であった。対照の酵母マンナン (mnn2) は同じ濃度で全く効果がなかった。少量の90 kDバンドのL - セレクチン - I g G ビーズによる沈殿もカルシウム依存性であり、M E L - 14 mAbにより阻害可能であり、そしてフコイジンおよびP P M E によりブロックされた。

30

## 【0175】

最後に、糖タンパク質のシアリダーゼ処理により、L - セレクチン - I g G による結合が阻害されることが見いだされた。ゆえに糖タンパク質上のシアリ酸は明らかに結合のために必須である。この結果はセレクチンとそのリガンドの間の相互作用の先の特徴付けと一致する。

40

## 【0176】

実施例2 クローニングおよび配列決定のための50 kD L - セレクチンリガンドの精製  
実施例1に記載した実験により、L - セレクチン - I g G キメラは末梢および腸間膜リンパ節により産生される ~ 50 kD硫酸化内皮リガンドの生物学的な特徴付けのために利用し得ることが示された。追加の実験により、末梢リンパ節 (P L N) を器官培養物中に入れたときにこのリガンドが容易に培地中へと放散されることが示されている [S. Watson - 未公開の観察結果]。ゆえに、配列決定のためのL - セレクチンリガンドの精製における最初の工程はネズミP L Nによる大量の培養培地の製造であった。劇的な精製を可能にし

50

た第二の観察は、～50 kD硫酸化L-セレクトインリガンドが培養培地のクロロホルム-メタノールによる処理の後に可溶性であったことである。この工程により硫酸化リガンドの>350倍の精製が行われた。次の精製工程は小麦麦芽凝集素アフィニティーカラムとなり、これはこのリガンド中の炭水化物の見かけの高含量を利用するものであった。最終精製工程ではL-セレクトイン-IgGキメラアフィニティーカラムを利用して該リガンドを精製した。この最終工程により、～50 kD領域内に含まれる物質がL-セレクトインに比較的高い親和性で結合し得る糖タンパク質に対応するであろうことが確認された。

#### 【0177】

腸間膜または末梢(頸部、上腕、腋窩)リンパ節を8～16週齢の雌性ICRマウスから集めた。マウスを処置してその腸間膜リンパ節を除去した。通常、培養培地の1バッチを30匹のマウスの腸間膜節から作製した。時には、さらに少数(全リンパ節重量の約5%)の末梢リンパ節を加えた。この節をカミソリ刃を用いて約1mm厚さの薄片に切断し、この薄片を2.5mM HEPES緩衝液、1U/mlペニシリンおよび1μg/mlストレプトマイシンを追加した100ml細胞培養ボトル中の標準的な細胞培養培地RPMI-1640(1ml)に加えた。培地と節の比は6ml/30腸間膜リンパ節であった。

#### 【0178】

培養ボトルを37℃インキュベーター中に置いた。4時間後、培地を15ml円錐形試験管中に注いで500×gで10分間遠心分離し、大きな組織破片を除去した。この上清を再び15ml Corex試験管中、20,000×gで15分間遠心分離した。得られた上清をまずNitexスクリーンを通して注ぎ、遠心分離の間にペレット化しない脂肪質の粒子を除去し、次いで液体窒素を用いて急速凍結して-20℃で保存した。

#### 【0179】

タンパク質精製計画をモニターする目的のために、<sup>35</sup>S O<sub>4</sub>-ラベル化Sgp50を上述の様に調製した培養培地に加えた。この物質は上述の培養培地1ml中の5マウス腸間膜リンパ節を0.5mCi Na<sup>35</sup>S O<sub>4</sub>(ICN)でラベルすることにより調製した。4時間後、細胞培養培地を除去してミクロ遠心機中で10分間遠心分離した。その上清を除去して100μl圧縮プロテインA-アガロースビーズ(Zymed Corp.)に加えることにより事前浄化し、4℃で一晩震盪した。事前浄化された培地を、Antibodies. A Laboratory Manual(1988) HarlowおよびLane, Cold Spring Harbor Laboratoryの522～523ページに概説されている方法に従い、1ml圧縮プロテインA-アガロース(Zymed)当たり10mgのL-セレクトイン-IgGで調製した3mlの共有架橋結合されたLEC-IgG-プロテインA-アガロース(LEC×プロテインA-アガロース)カラムに加えた。カラムを6時間から一晩L-セレクトイン×プロテインA-アガロースと共に震盪した後に、10容量のダルベッコのリン酸緩衝食塩水(PBS)を用いて洗浄し、精製された物質(GlyCAMとしても知られる50kD L-セレクトインリガンド)をPBS中の4mM EDTA(10ml)で溶離した。この物質をCentricon 30(Amicon Corp.)上で濃縮して最終容量を約100μlにした。約60,000cpmの物質が得られた。

#### 【0180】

微量配列決定分析のための精製タンパク質を製造するために、4バッチ(約120マウス)の培養培地(24ml)を解凍した。50μlの<sup>35</sup>S O<sub>4</sub>-ラベル化Sgp50(32,000cpm)を加えた。9容量(216ml)のクロロホルム:メタノール(2:1)を加えて50ml円錐形試験管中で30分間室温で震盪し、500×gで20分間遠心分離した。上部の水層を集め、「界面」層を再度遠心分離してできるだけ多くの水層を抽出した。このクロロホルム:メタノール抽出を繰り返した。水層を見るために、約20mlのPBSを加えた。水層を集めて、残留したクロロホルム:メタノールは水層を1リットルのビーカーに入れて換気フード中の温水浴中で3時間攪拌することにより蒸発させた。次に、以下において<C:M(「クロロホルム:メタノール分配後」)と称されるこの物質をPBSに対して4時間透析した。同様の製造において、1385倍の精製がなされた。19200cpmを有する透析された<C:Mを4mlの小麦麦芽凝集素(WGA)-アガロースゲル(Vector Laboratories)と共に4℃で一晩震盪した。このゲルをカラム中に集め、PBS(

10

20

30

40

50

40 ml) で洗浄し、PBS中の0.2 M n - アセチルグルコサミンで溶離した。同様の実験において、さらに4.4倍の精製がなされた。マウス60匹に相当する約15000 cpmを含有しているこの物質をCentricon 30上で濃縮し、標準的なLaemmliの方法の下で10% SDS - ゲル上を流した。同様の実験において、LEC x プロテインA - アガロース上での最終精製により全体で60606倍の精製が得られた。次いで該タンパク質をBioRadミニプロッター(250 mA定電流で2時間)においてProBlott膜(APPLIED Biosystems Incorp.)上に電気プロットした。この膜(プロット)を製造者の勧めに従いクーマシーR-250で染色し、汚れを除いた。このプロットを風乾してオートラジオグラフィーをKodak XARフィルムを用いて行った。

【0181】

次いで精製された物質を気相微量配列決定に供した。

【0182】

実施例3 タンパク質配列決定

ポリペプチド配列は、実施例2に記載したように精製した物質の気相微量配列決定により決定した。L - セレクチン - IgGアフィニティーカラムから溶離されたタンパク質を10% SDS - ゲル上で流し、Problott膜(Applied Biosystems Inc.)上に電気プロットし、クーマシーR250で染色し、汚れを除いた。このプロットを風乾してKodak XARフィルムに露出して硫酸塩ラベル化リガンドの位置を検出した。ゲルのこの領域を切り出して気相微量配列決定にかけた。配列決定は本質的に上記に記載したように行った。

【0183】

ポリペプチド配列決定により、約5 pMレベルで明白な25アミノ酸の範囲が明らかになった(図3B)。

【0184】

実施例4 ~50 kD L - セレクチンリガンドのcDNAクローニングおよび配列分析  
 ネズミ末梢リンパ節cDNAライブラリーはInvitro Gen cDNAライブラリーキットおよびネズミ末梢リンパ節から単離されたポリA + RNAを用いて構築した。重複したオリゴヌクレオチドプローブのプールは、N末端配列の9~17残基(QMKTPMDA)から哺乳動物コドン使用規則を基にして選択された縮重したコドンを用いて得た。コドンはCAG、ATG、AAG、AAA、ACA、ACT、ACC、CCA、CCT、CCC、GATまたはGACであった。GCのみを5'Alaコドンのために用いた。26-merオリゴヌクレオチドをポリヌクレオチドキナーゼにより<sup>32</sup>Pラベル化し、1,000,000のgT10バクテリオファージを20%ホルムアミド、5xSSC(150mM CaCl<sub>2</sub>、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xDenhardt溶液、10%硫酸デキストランおよび20 μg/mlの変性して勇断したサケ精子DNAを含む20プレートから得た複製ニトロセルロースフィルターに42°Cで一晩ハイブリダイズさせた。このフィルターを1xSSC、0.1%SDS中、42°Cで2回30分間洗浄して-70°Cで一晩オートラジオグラフィーを行った。1個の複製物の陽性ファージをブランク精製し、EcoRI挿入物をpGEMベクター中にサブクローン化した。両鎖の全ヌクレオチド配列はSequenaseキットによるスーパーコイン(supercoin)配列決定により得た。In situハイブリダイゼーションおよびノーザンプロット分析のために、ポリA尾部を欠いているポリメラーゼ連鎖反応フラグメントを合成し、次いでpGEMベクター(PROMEGA)中にサブクローン化した。コード化cDNAのヌクレオチド配列を図4に示す。該クローンは151アミノ酸からなる1個の読み取り枠を有する短い(約600 bp)cDNAを含んでいた。「Kozak box」(CCACCATGA)は最初のコード化メチオニンの回りに見られた[Kozak, M. CellBiology 115:887 (1991)]。このメチオニンに続いて、タンパク質の分泌経路への移動のためのシグナル配列として機能すると思われる19アミノ酸の長い疎水性の高い配列が存在した。この領域に続いてL - セレクチン - IgG結合物質のN末端配列決定により決定された配列とほとんど正確に対応している配列が存在する。このシグナル配列がプロセシングされた132アミノ酸タンパク質はセリンおよびトレオニンに非常に富み、これらの残基に対応する約29%のコード化アミノ

10

20

30

40

50

酸を有していた。

【 0 1 8 5 】

おそらくもっと重要であろうが、これらのセリンおよびトレオニン残基は糖タンパク質の2つの領域に密集していることが見いだされた(図3D)。領域1(残基42~63)は12個のセリンまたはトレオニンを含む(~55%)ことが見いだされた一方、領域11(残基93~122)は14個のセリンまたはトレオニン残基を含む(~48%)ことが見いだされた。これらの領域内で、セリンおよびトレオニン残基は通常2、3または4つの群に密集していることが見いだされた。このタンパク質はシステイン残基を欠き、1個の可能性のあるN-結合性グリコシル化部位(残基115~117)が存在していた。システイン残基の欠如は、SDS-ポリアクリルアミドゲル上の硫酸塩-ラベル化リガンドの移動度がジスルフィド還元剤の不在により影響されないことを示した以前のデータ(S. ImaiおよびS. Rosen未公開の観察結果)と一致していた。さらに1個の可能性のあるN-結合性部位は、以前に示された~50kDリガンド上のN-グリカナーゼ(glycanase)-感受性の炭水化物側鎖が少数であることと一致した。最終的に、プロセシングされたタンパク質の分子量は~14,154kDであることが見いだされた。単離されたL-セレクチンリガンドの分子量は~50kDであるから、この結果により~70kDの糖タンパク質の塊りはO-結合性炭水化物であることが示され〔CarrawayおよびHull, BioAssays 10(4), 117-121 (1989)〕、結果は単離された糖タンパク質をクーマシーブルーで染色することができないことと一致する。

10

【 0 1 8 6 】

このcDNAによりコードされるタンパク質のC末端を調べることにより、穏やかな疎水性領域が明らかとなったが、明らかなトランス-メンブラン・アンカーリングモチーフはなかった。この領域がホスファチジルイノシトール(PI)尾部の付加を支配しているシグナルに対応する可能性がある一方で、リンパ節切片のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼC(PIPLC)による処理ではリガンドを内皮細胞から除去しないようである(M. Singer, S. Watson, R. Mebius - 未公開の観察結果)。この結果は~50kDリガンドがP1尾部を用いて細胞表面と結合する可能性の反証を挙げるものではないが、これは他の可能性のある細胞表面への結合がこの糖タンパク質により利用されているかもしれないことを示唆する。両親媒性ヘリックスを探索するプログラムを用いてC末端の21アミノ酸を調べることにより、この糖タンパク質のC末端は非常に重要な両親媒性ヘリックスをコードしていることが明らかになった(図3C)が、この可能性のあるヘリックス領域の1つの面は非極性残基を含んでおり、また他の面は極性残基を含んでいる〔J. Mol. Biol. 81:155 (1984)〕。

20

【 0 1 8 7 】

実施例5 ペプチドに対する抗体の製造

単離されたcDNAがL-セレクチンリガンドのタンパク質の背骨に対応する配列をコードすることを最終的に証明するために、本発明者らは単離されたりガンドcDNAのヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列から得られるペプチドをApplied Biosystemsペプチド合成装置上で製造した。N-末端(CAM01:LP SKDELQMKTC)、タンパク質の中央領域(CAM02:CKEPSIFREELISKD)、およびタンパク質のC末端(CAM05:CII SGASRITKS)に由来するペプチドを、付加した下線システイン残基を介して鍵穴カサガイ(keyhole limpet)のヘモシアニンに結合させ、ウサギに注射し、続いて通常の免疫実験を行った。免疫前の血清および接種されて追加免疫されたウサギから得た血清を集め(ここでウサギポリクローナル抗ペプチド血清をCAM01、CAM02、CAM05と称する)、各血清を、上記の様にL-セレクチン-IgGキメラに結合させることにより精製した硫酸塩ラベル化L-セレクチンリガンドを免疫沈降させるその能力について試験した。

30

40

【 0 1 8 8 】

クローン化タンパク質がL-セレクチンIgGキメラを用いて培養培地から精製された<sup>35</sup>S-ラベル化物質と同じであることを証明するために、L-セレクチン-IgG精製<sup>35</sup>S

50

- ラベル化物質の免疫沈降を行った。2つの別々の実験について以下の方法を用いた。免疫沈降ビーズの調製のために、25  $\mu$ l パック化プロテインA - セファロースビーズ (Zymed Laboratories) + 25  $\mu$ l ウサギ血清 + 350  $\mu$ l PBS をマイクロ遠心管中で共に4で3時間震盪させる。各試験管をPBSで3回洗浄して非結合免疫グロブリンを除去すると、25  $\mu$ l のビーズのみが残る。約6,000 cpmのL - セレクチン - IgG精製<sup>35</sup>S - ラベル化物質を含有しているPBS (60  $\mu$ l) を加える。これを15分ごとに試験管を軽く動かしながら氷上で3時間インキュベートする。3時間後、マイクロ遠心管を回転させてビーズをペレット化する。上清 (45  $\mu$ l) を取り去り、4 x Laemli サンプル緩衝液 (15  $\mu$ l) と混合してSDS - PAGE分析のために煮沸する。ペレット化されたビーズをPBSで3回洗浄し、新しい試験管に移し、上清を静かにデカンテーションして試験管中に最終容量45  $\mu$ lを残す。4 x Laemli サンプル緩衝液 (15  $\mu$ l) を加えてSDS - PAGE分析のために煮沸する。このSDSゲルは還元条件下で流した。免疫グロブリン重鎖は還元条件下では50 kDで流出し、ラベルされたバンドを圧縮する。この実験において免疫前の血清はいずれも該ラベルと相互作用しないが、一方でCAM01およびCAM05は部分的な効果を有し、CAM02は該バンドを完全に免疫沈降させる。この実験を以下の差異のもとにCAM02について繰り返した。該ゲルを50 kDバンドが圧縮されないように非還元条件下で流した (本発明者らは還元条件下のSDSゲルにおいてL - セレクチン - IgG精製<sup>35</sup>S - ラベル化物質が移動性を変化させないことを事前に確認していた)。さらに、1つの試験管について、抗体 - 抗原相互作用の特異性を示すために、CAM02抗体を被覆したビーズを1 mg/ml CAM02ペプチドと氷上で30分間予めインキュベートした。最終的に、同様の実験計画を用いてCaltagが作成したL - セレクチンのC末端ペプチドに対する無関係な対照ペプチド抗体 [ROSY (ロージー) 1Bと称する] も試験した。両ゲルをEnhance (New England Nuclear) を用いた蛍光間接撮影法に供し、Kodak Xarフィルムを用いてオートラジオグラフィを行った。CAM02はL - セレクチン - IgG精製<sup>35</sup>S - ラベル化物質を完全に免疫沈降させ、CAM02免疫前およびROSY 1Bは効果を有さない。遊離のCAM02ペプチドは特異的な免疫沈降をブロックする。この結果を図5AおよびBに示す。

【0189】

実施例6 L - セレクチンリガンドの発現

図6は~50 kD L - セレクチンリガンドをコードしているmRNAのノーザンプロット分析を示す。図6Aにおいて見られるように、mRNAはポリA + 分画中にコードされており、~0.7 kDの分離したバンドに対応する。このバンドの鮮明度は有意なレベルの別のRNAスプライシングの反証となっており、単離されたりガンドクローンを用いたネズミPLN cDNAライブラリーの再スクリーニングにより、他のいかなるスプライスされた形態のメッセージも明らかにされていない。リンパ節により排出される領域での炎症応答の誘導により、リガンドをコードしているmRNAの量の相対的な減少が示されており、これはおそらく新しく移動しているリンパ球由来のポリA + mRNAの大きな寄与によるものであろう。この結果はリガンドが炎症の間、PLN HEV中に劇的に誘導されるようではないことを示すが、この実験から量的な結論を出すのは困難である。異なる領域のリンパ節におけるこのmRNAの発現を調べることにより、本発明者らが調べた全ての領域のPLNにおいてこれが発現されていることが示された (図6B)。

【0190】

多くの異なるリンパ系および非リンパ系組織におけるL - セレクチンリガンドをコードしているmRNAの発現の分析により、この配列は非常に組織 - 特異的な方法で発現されていることが明らかである。図6Cは該リガンドに対応するmRNAが腸間膜および末梢リンパ節の両方において強力に発現されることを示す。これは、硫酸塩 - ラベル化リガンドがこれらの2つの器官においてのみ発現されることが見いだされた以前の実験と一致する。さらにこのメッセージは肺において有意なレベルで、そしてバイアー斑において非常に低いレベルで発現される。このmRNAは多くの非リンパ系器官においては検出不可能であり、他の2つのリンパ系器官、脾臓および胸腺において見いだされない。この後者の結

10

20

30

40

50

果により、リガンドが脈管構造のサブセット、すなわち末梢リンパ系組織において見られるHEVにおいてのみ有意に発現され得ることが強く示唆される。

【0191】

該リガンドmRNAがHEVにおいて発現されることを証明するために、in situハイブリダイゼーションを行った。既述の方法〔Wilcoxら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2839 (1989)〕を用いてin situハイブリダイゼーションによりリガンド発現について組織を分析した。末梢リンパ節およびパイアー斑を有する小腸の切片をマウスから採取し、パラホルムアルデヒド中に固定化し、次いでスクロースに浸した。組織をOCT化合物(Miles Scientific)中に埋め込み、イソペンタン中で凍結させて8ミクロン切片に切断した。この切片をVectabond被覆化スライド(Vector Laboratories)上に解凍・固定した。<sup>35</sup>S-ラベル化RNAプローブは既述の方法(Meltonら1984)を用いてセンスおよびアンチセンス方向で生成させた。ハイブリダイゼーションのために、切片を4%パラホルムアルデヒド(10分間)、プロテイナーゼK(1 μg/ml、10分間)で順に処理し、続いて100 μlのハイブリダイゼーション緩衝液(50%ホルムアミド、0.03M NaCl、20 mM トリス-HCl、5 mM EDTA、1×Denhardt溶液、5%デキストラン硫酸、10 mMジチオトレイトール)を用いて42°Cで2時間プレハイブリダイゼーションした。プローブを最終濃度8×10<sup>6</sup> cpm/mlで加え、次いで55°Cで一晩インキュベーションした。スライドを10 mMメルカプトエタノール(BME)、1 mM EDTAを含む2×SSCで洗浄し、続いて30分間の処理(20 μg/mlで30分間)をした。EDTAおよびBMEを含む0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を55°Cで2時間行った。スライドを0.5×SSC中で洗浄し、エタノールの濃度を上昇させることにより脱水し、真空乾燥した。スライドをNTB2核乳剤(Kodak)中に浸し、5週間まで感光させた。スライドを現像し、ヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。陰性対照はセンスプローブを有する一連の切片のハイブリダイゼーションからなっていた。図7に見られるように、単離されたリガンドcDNAクローンによりコードされているアンチセンス鎖は末梢リンパ組織のHEVに明らかにハイブリダイズするが、センス鎖はいかなる有意なハイブリダイゼーションも示さない。この結果によりリガンドcDNAに対応するmRNAはHEV細胞により合成され、腸間膜およびPLNのこの領域へのL-セレクチンリガンドの局在性を示している以前の免疫組織化学的なデータと一致することが明白に示される。

【0192】

本明細書中に開示されるデータは、L-セレクチンに対する内皮性リガンドが独特のムチン型糖タンパク質であるという仮説と一致する。定義によりムチンは、セリン/トレオニンに富むタンパク質であり、その分子量は主にO-結合性炭水化物側鎖によるものである〔Cysterら, The Embo J. 10:893 (1991), Fukuda, M., Glycobiology 1:347 (1991), Gendlerら, Am. Rev. Respir. Dis. 144:S42 (1991), Gumら, The J. of Biol. Chem. 266:22733 (1991), Porchetら, Am. Rev. Resp. Dis. 144:S15 (1991)〕。本明細書中で開示されるL-セレクチンリガンドにおいて見られる高いセリンおよびトレオニン含量は、タンパク質の高度なグリコシル化(分子量で~70%)と一緒にあって、リガンド上の炭水化物の大部分が実際にO-結合性であることを示唆し、~50 kDの硫酸化PLNリガンドのN-グリカナーゼ耐性を示している以前の実験が確認された。O-結合性炭水化物がL-セレクチンのレクチンドメインにより媒介される接着性相互作用に直接関係するようであるという事実は、本明細書中で開示されるタンパク質の背骨の役割が炭水化物の提供のための骨格としてのものであるらしいことを示唆する。ゆえに、このタンパク質は組織-特異的な方法でL-セレクチンのレクチンドメインに炭水化物を提供するために機能する新規な型の細胞接着分子を表す。このように、この「骨格」の局所での発現がリンパ球群の局所交通の結果を与えるのであろう。

【0193】

セレクチンへの炭水化物提供のための骨格としてのムチン様糖タンパク質の使用は、ムチン構造について現在知られていることとの関連の上で見たとときに意味を持つ。ムチン等の

10

20

30

40

50

高度なO-結合性糖タンパク質の構造の以前の研究により、これらの分子が高度に拡張された、いくらか棒状の分子である傾向があることが明らかになっている。例えば、白血球表面のムチン・ロイコシアリン(シアロホリン、CD43)(Cysterら, 1991, 上記; Fukuda 1991, 上記)は固い棒状構造を形成することが示されており、他のムチンの物理化学的分析により同様の棒状構造が特に高度なO-グリコシル化領域において示されている〔Harding, S. E., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 47:345 Academic Press, Inc. (1989), Jentoft, N., *TIBS* 15:291 (1990)〕。さらに、他の非-ムチンタンパク質、例えば崩壊促進因子(DAF)および低密度リポタンパク質(LDL)レセプターは、グリコカリックスを介してレセプターを広げるように機能し得る棒状のドメインを形成するらしい高度なO-結合性ドメインを細胞表面の近くに有する(Jentoft 1991, 上記)。この棒状構造はまさに、セレクチンのレクチンドメインに炭水化物を提供することを役割とする分子について予想されるであろう構造である。図6に図示したモデルに示すように、L-セレクチンリガンドはHEVの管腔中に拡張する「瓶洗いブラシ」として考えることができる。これにより、リンパ球表面に局在化しているL-セレクチンのレクチンドメインに多数のO-結合性炭水化物リガンド(ブラシの荒毛)が適切に提供され、このようにして内皮細胞への接着を媒介する。リガンド上の2つのドメインへのこれらの炭水化物の見かけ上の密集は、リンパ球-HEV接着性相互作用の結合親和力を高めるために多価の様式でそれらが提供され得ることを示唆している。即ち、L-セレクチンリガンドのムチン様の性質は、拡張された棒状のプラットホームを介して多価の炭水化物リガンドをL-セレクチンのレクチンドメインに提供するように機能し得るであろう。的確に言えば、これは免疫系における細胞接着の新しい機構を規定するものであろう。

#### 【0194】

本明細書中で開示された発現分析により、L-セレクチンにより媒介される局所のリンパ球交通の調節がリガンドmRNAの組織特異的発現によるものであろうと示唆される。本発明者らは、L-セレクチンを介するリンパ球-HEV相互作用を媒介しているとして以前に記載された組織のみがリガンドに対する高レベルのmRNAを発現することを見いだしたが、パイアー斑における非常に低レベルのmRNAは多少予期しなかったことであった〔Gallatin, *Cell* 44:673 (1986), Butcher, *Am. J. Pathol.* 136:3 (1990), Imaiら, *J. Cell Biol.* 113, 1213 (1991), Streeterら, *J. Cell Biol.* 107, 1853 1988b, Woodruffら, *Annu. Rev. Immunol.* 5, 201 (1987)〕。これらの結果は、局所の交通は少なくとも一部分において本明細書中に開示した該リガンドmRNAの転写活性化により制御されているという可能性と一致し、外因性因子はリガンド遺伝子の転写を制御することによりL-セレクチン-介在性接着を調節し得ることを示している。もちろん該リガンドのタンパク質の背骨はL-セレクチン接着を媒介するには不十分であり、この背骨上に見られる炭水化物リガンドの作成に関与するグリコシル-トランスフェラーゼを制御している遺伝子も転写調節されているかもしれない。この後者の可能性は、非-HEV細胞において本明細書中に開示したcDNAの発現により産生されるリガンド糖タンパク質の活性を調べることにより現在試験可能である。別レベルの調節が、適当なL-セレクチン-特異的炭水化物側鎖を~50kDリガンドが受容する一方で他のO-結合性糖タンパク質が受容しない機構に関係しているのかもしれない。本明細書中に開示されるL-セレクチンリガンドが慢性または急性の炎症部位において異所的に発現され、リンパ球または好中球の交通を媒介し得るという可能性は研究すべきものとして残されている〔Watsonら, *Nature* 349:164 (1991)〕。パイアー斑において検出される非常に低いレベルのリガンドmRNAの発現はこのような調節可能な異所性の発現を示すものである可能性がある。

#### 【0195】

本明細書中に開示される~50kDのリガンドがタンパク質-炭水化物相互作用を介してL-セレクチンに容易に接着することは明らかであるが、このリガンドが内皮細胞表面と結合する機構は明らかにすべきものとして残されている。本発明において見いだされた急速な放散は器官培養物の人工産物であり得たが、該リガンドの活性化放散型がウシ(J. Gilbert - 未公開観察結果)またはネズミ(S. Watson - 未公開観察結果)血清から精製し得

ることを示している他のデータはこのリガンドがインビボで放散され得ることを示している。他の多くの細胞表面接着分子、例えばL - およびP - セレクチン〔Johnstonら, Cell 56, 1033 (1989)〕およびICAM 1〔Rothleinら, J. Immunol. 147:3788 (1991)〕は放散されることが見いだされており、多くの場合においてこの放散は生理学的に重要であるらしい。本明細書中に報告したリガンドの急速な放散は、HEVの管腔表面との比較的ゆるい結合を示す。このような結合の1つは上記の両親媒性ヘリックスによる媒介が可能であり、図8に示すモデルで説明することができた。このヘリックス領域は膜に架橋して同時に膜の接着およびリガンドのオリゴマー型の形成を媒介することができた。該リガンドがオリゴマー化し得ることはゲル濾過実験の間に見いだされた(Y. ImaiおよびS. Rosen - 未公開観察結果)。他の多くのタンパク質は両親媒性ヘリックスを膜結合および孔形成のために利用することが見いだされており〔Haffarら, J. Cell Biol. 107:1677 (1988), Eisenberら, J. Mol. Biol. 179:125 (1984), Finer-MooreおよびStroud, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:155 (1984)〕、ゆえにこのドメインはL - セレクチンリガンドの場合に同様の様式で機能し得る可能性がある。別の仮説は、両親媒性ヘリックスが内皮細胞表面とより堅固に結合されている別のタンパク質と弱い相互作用をし得るというものである。また、該リガンドは現在不明の様式でグリコカリックス中に組み込まれてる可能性がある。最後の可能性は、L - セレクチンレクチンドメインに結合するいくつかのHEVリガンドが存在し、そのうちのいくつかは、例えばImaiら〔(1991), 上記〕により開示されている~90 kD硫酸化リガンドまたはStreeterら〔J. Cell Biol. 107, 1853 (1988b)〕により開示されているPLNアドレシン等の様に内皮細胞表面と堅固に結合されており、そして他のものは本明細書中に開示される~50 kDリガンドの様に放散されるというものである。

#### 【0196】

本明細書中に開示したムチン様内皮性リガンドとモノクローナル抗体MECA79により定義される既に報告されているタンパク質の群〔pln“アドレシンス” Streeterら, Nature (Lond.) 331:41, J. Cell Biol. 107, 1853 (1988), Bergら, Immunol. Rev. 108:5 (1991)〕の間の関係は明らかにすべきものとして残されている。Imaiら〔(1991), 上記〕は本明細書中に開示したリガンドがMECA79抗体(未知の炭水化物決定基に結合する抗体)により認識されることを既に示したが、Streeterら〔(1988b), 上記〕およびBergら〔(1991), 上記〕は多くの他の糖タンパク質もこの炭水化物様エpitepを発現するらしいことを示している。したがって、L - セレクチンのレクチンドメインに炭水化物を提供する他の内皮性糖タンパク質が存在する可能性がある。ゆえに本明細書中に報告したムチン様リガンドに特異的なモノクローナル抗体の開発は、L - セレクチン - 介在性の交通のための接着性リガンドとして本糖タンパク質と他のものの相対的な寄与の評価を可能にするであろうから、非常に重要であろう。

#### 【0197】

~50 kDのL - セレクチンリガンドは免疫系における細胞接着に関与する分子の4番目の型である: 1) 白血球インテグリン、2) そのリガンド、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリー構成員、3) セレクチン、および4) ~50 kD L - セレクチンリガンド。該インテグリン、Igスーパーファミリー構成員、およびセレクチンの全ては種々の関連の分子を含んでいるファミリーからなることが見いだされている。本明細書中に開示したリガンドの特徴のゆえに、本発明者らはこの出願中に用いた扱いにくい名称をより記述的な用語であるGLYCAM1〔GLYcosylation dependant Cell Adhesion Molecule(グリコシル化依存性細胞接着分子)〕と置き換えることを提案する。

#### 【0198】

上記に特に好ましい態様について示しているが、本発明はそのように限定されないことは理解されるであろう。当業者は、開示された態様に対して本発明の全体の概念から逸脱ことなく種々の修飾を行うことができるであろう。このような全ての修飾は本発明の範囲内にあることが意図されている。

#### 【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、cDNAクローニングにより決定されたセレクトイン(L E C - C A M)ファミリー構成員の構造を示す。示したのはL - セレクトイン、E - セレクトインおよびP - セレクトインの構造である。レクチン、上皮増殖因子(E G F)、および多重性短共通反復(multiple short consensus repeats)(S C R s)を、Johnstonら[Cell 56, 1033 (1989)]により最初にG M P - 1 4 0について提示された仮定的なジスルフィド結合と共に示す。また、N末端配列(後に成熟タンパク質において切断される)を疎水性トランスメンブラン・スパニング・アンカー(T M)および細胞質尾部と共に示す。またP - セレクトインの他の2つの形態を示すが、一方はscr - 7ドメインを欠失し、もう一方はメンブラン・スパニング・アンカーを欠失している。

【図2】図2はセレクトインファミリーの構成員をコードしている遺伝子の構造を示す。ヒトおよびネズミのL - セレクトイン、ヒトE - セレクトインおよびヒトP - セレクトインをコードしているゲノム構造を示す。黒い箱は様々な構造のモチーフをコードするエキソン、例えばネズミ遺伝子の開始コドン(A T G)、シグナル配列(S S)、レクチン(L E C)、上皮増殖因子(E)、短共通反復(S C R)、トランスメンブラン・アンカー(T M)および細胞質ドメイン(C D)、およびこれらのタンパク質コード化ドメインを隔てるイントロンをコードする介在領域を示す。ヒトにおいては、3つ全てのセレクトイン遺伝子は互いに染色体1の長アーム上の一群のタンパク質(その全てが異なる数の短いS C Rエキソンを含む)をコードしている遺伝子座の近くの200キロ塩基以内にある。またネズミL - セレクトインはネズミ染色体1上であって、ヒト染色体1相同体において見い出される領域と同調の領域中にコードされている。

【図3A】図3Aは~50kD L - セレクトインリガンドの精製およびN末端アミノ酸配列を示す。培養培地からのリガンドの精製は後に添加した<sup>35</sup>S - ラベル化リガンドによりモニターした。レーンA: 開始培養培地。レーンB: クロロホルム: メタノール分配後の水層。レーンC: L E C - I g G結合物質であり、括弧で囲んだ範囲を気相タンパク質配列決定のために切り出した。レーンA - CはクマシーR - 250で染色したProBlott膜である。レーンDはレーンCのオートラジオグラフである。

【図3B】図3B: 末端アミノ酸配列。

【図3C】図3C: C末端の21のアミノ酸を回転(wheel)プログラムにより分析した。このプログラムはヘリックス領域の円筒部を見下ろしたものを表示し、ヘリックスの周りのアミノ酸残基を示す。非極性のアミノ酸は白抜きの囲みで示し、極性のアミノ酸は陰をつけた囲みで示す。

【図3D】図3D: Aにおける推定アミノ酸配列から得たハイドロパシー・プロットを示す。黒丸はセリンまたはトレオニン残基に対応し、白抜きの丸は可能性のある1個のN - 結合性グリコシル化部位のA S Nである。~50kDリガンドの推定されたドメイン構造をシグナル配列(S S)、O - 結合性領域IおよびIIならびにC末端両親媒性ヘリックス領域と共に上に示す。

【図4A】図4はL - セレクトインに対する内皮性リガンドのコアタンパク質のヌクレオチドおよびコードされたアミノ酸配列を示す。陰を付けていない囲みは最初のメチオニンコドンの周りのKozak翻訳開始部位を示す。残基20を起点とする点線を下に付けたアミノ酸配列は、位置34のT H R(N末端配列ではM E T)を除き、L - セレクトイン精製リガンドのN末端配列決定により決定されたアミノ酸配列(図3B)に対応する。推定されたアミノ酸配列中のセリンおよびトレオニン残基は陰をつけた囲み中に示す。

【図4B】図4はL - セレクトインに対する内皮性リガンドのコアタンパク質のヌクレオチドおよびコードされたアミノ酸配列を示す。陰を付けていない囲みは最初のメチオニンコドンの周りのKozak翻訳開始部位を示す。残基20を起点とする点線を下に付けたアミノ酸配列は、位置34のT H R(N末端配列ではM E T)を除き、L - セレクトイン精製リガンドのN末端配列決定により決定されたアミノ酸配列(図3B)に対応する。推定されたアミノ酸配列中のセリンおよびトレオニン残基は陰をつけた囲み中に示す。

【図5A】図5Aは、L - セレクトイン精製した~50kDリガンドのペプチド抗体による免疫沈降を示す。図5Aおよび5Bの説明のための記号は以下の通りである:

10

20

30

40

50

P 1 = 免疫前 C A M 0 1 - ビーズ  
 P s 1 = 免疫前 C A M 0 1 - 免疫沈降後に残った上清  
 I 1 = 免疫 C A M 0 1 - ビーズ  
 I s 1 = 免疫 C A M 0 1 - 免疫沈降後に残った上清  
 P s 2 = 免疫前 C A M 0 2 - 免疫沈降後に残った上清  
 I s 2 = 免疫 C A M 0 2 - 免疫沈降後に残った上清  
 I 2 = 免疫 C A M 0 2 - ビーズ  
 P E P = 遊離のペプチド

【図 5 B】図 5 B は、L - セレクチン精製した ~ 5 0 kD リガンドのペプチド抗体による免疫沈降を示す。

10

【図 6 A】図 6 : ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドをコードしている mRNA の発現のノーザンプロット分析。A : 全体 ( a ) またはポリ A + ( b , c ) RNA を正常 ( a , b ) または炎症を起こした ( c ) 末梢リンパ節から単離し、ホルムアルデヒドゲル上で泳動し、図 4 に示した c DNA を用いたノーザンプロット分析により分析した。

【図 6 B】図 6 : ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドをコードしている mRNA の発現のノーザンプロット分析。B : ポリ A + RNA を a ) 上腕、b ) 腋窩、c ) くび、d ) 膝窩および e ) 全末梢リンパ節から単離し、A、C および D において記述するようにノーザンプロットにおいてリガンド c DNA とハイブリダイズさせた。ポリ A + RNA を a ) 末梢リンパ節、b ) 肝臓、c ) バイヤー斑、d ) 胸腺、e ) 骨格筋、f ) 腸間膜リンパ節、g ) 精巣、h ) 肺、i ) 心臓、j ) 脾臓、k ) 脳および l ) 腎臓から単離し、ノーザンプロット上で ( C ) L - セレクチンリガンドに対応する c DNA または ( D ) ニワトリ アクチン c DNA とハイブリダイズさせた。

20

【図 6 C】図 6 : ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドをコードしている mRNA の発現のノーザンプロット分析。ポリ A + RNA を a ) 末梢リンパ節、b ) 肝臓、c ) バイヤー斑、d ) 胸腺、e ) 骨格筋、f ) 腸間膜リンパ節、g ) 精巣、h ) 肺、i ) 心臓、j ) 脾臓、k ) 脳および l ) 腎臓から単離し、ノーザンプロット上で ( C ) L - セレクチンリガンドに対応する c DNA とハイブリダイズさせた。

【図 6 D】図 6 : ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドをコードしている mRNA の発現のノーザンプロット分析。ポリ A + RNA を a ) 末梢リンパ節、b ) 肝臓、c ) バイヤー斑、d ) 胸腺、e ) 骨格筋、f ) 腸間膜リンパ節、g ) 精巣、h ) 肺、i ) 心臓、j ) 脾臓、k ) 脳および l ) 腎臓から単離し、ノーザンプロット上で ( D ) ニワトリ アクチン c DNA とハイブリダイズさせた。

30

【図 7 A】図 7 : ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドをコードしている mRNA の発現のその場でのハイブリダイゼーション分析。末梢リンパ節切片を L - セレクチンリガンド c DNA に対応しているアンチセンス ( A ) ハイブリダイゼーションプローブとハイブリダイズさせ、洗浄し、感光乳剤に 6 週間感光させて現像した。HEV の形態は細静脈の周りの点線で示す。

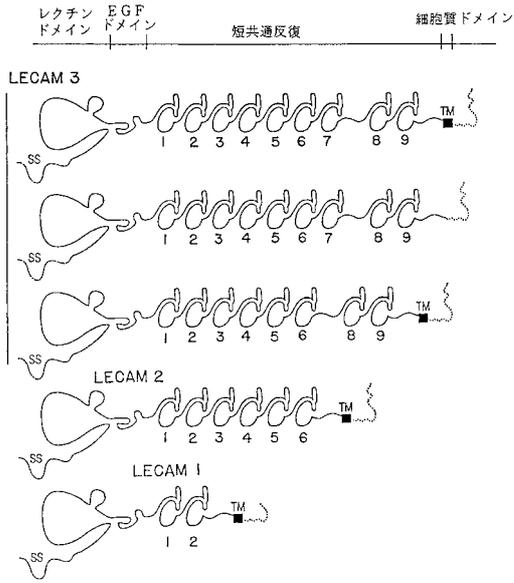
【図 7 B】図 7 : ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドをコードしている mRNA の発現のその場でのハイブリダイゼーション分析。末梢リンパ節切片を L - セレクチンリガンド c DNA に対応しているセンス ( B ) ハイブリダイゼーションプローブとハイブリダイズさせ、洗浄し、感光乳剤に 6 週間感光させて現像した。HEV の形態は細静脈の周りの点線で示す。

40

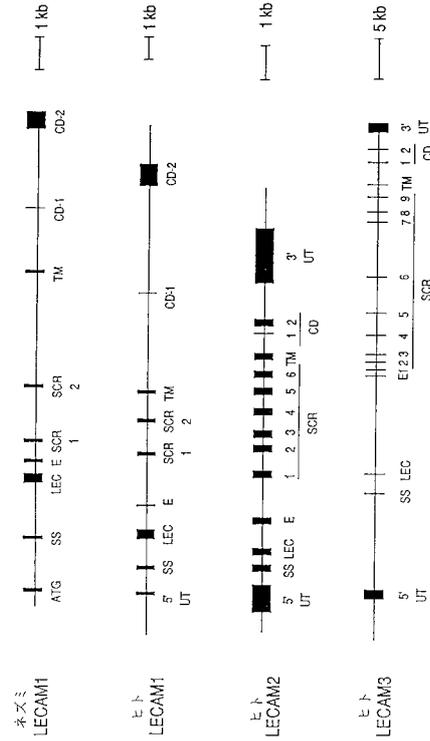
【図 8】図 8 : ~ 5 0 kD セレクチンリガンド構造のモデル。末梢リンパ節 HEV の管腔表面上の ~ 5 0 kD L - セレクチンリガンドの構造についての 1 つの可能なモデルを示す。拡張されたブラシ様の領域は、高度に O - グリコシル化された状態における O - 結合性領域 I および II に対応する。拡張が少ない領域は N 末端および中央のセリン/トレオニンに乏しいドメインに対応する。このモデルにおいて膜接着は、極性領域が互いに相互作用してオリゴマーを形成し、ヘリックスの非極性面が脂質二重層と相互作用するような、C 末端の両親媒性ヘリックス領域のオリゴマー化およびこれらの領域の膜への挿入により行われる。本明細書中に開示するように、他の多数のモデルもまた等しく存在し得る。

50

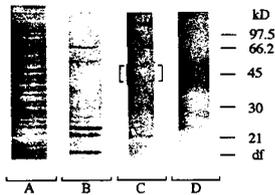
【 図 1 】



【 図 2 】



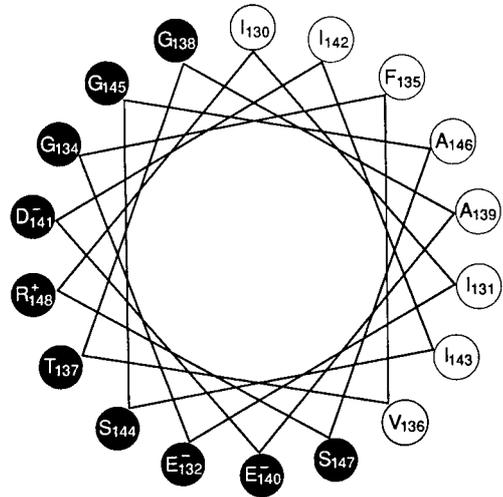
【 図 3 A 】



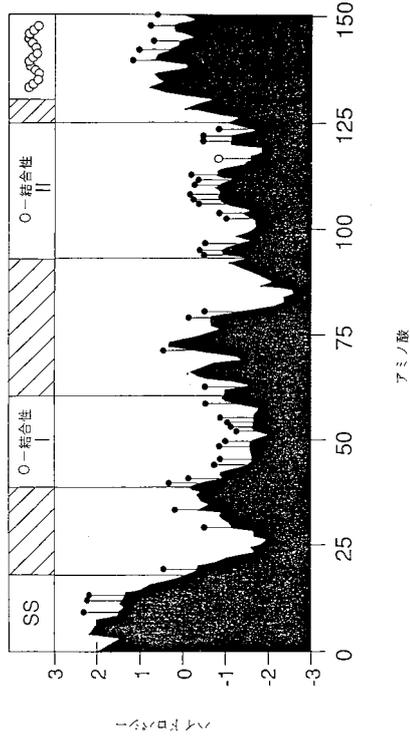
【 図 3 B 】

L P G S K D E L Q M K T Q P M D A I P A A Q  
 Q R Y

【 図 3 C 】



【 図 3 D 】



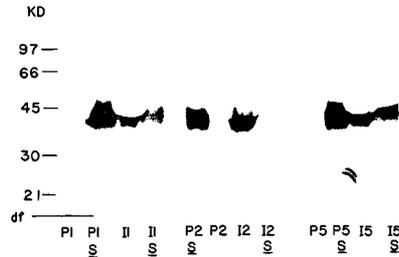
【 図 4 A 】

1 CTGACCTGT TCCAGTCCA CCATGCAATT CTTCACTGTC CTGCTATTGG TCAGTCTTGG  
 GACTGGACA AGGTCACGGT GGTACITTA GAAGTGCAG GACGATAAAC AGTCAGAACC  
 1 METLYSPH EPHETHRYAL LEULEUPHEV A[SE]LEUALA  
 61 TCCACCTCT CTTCTCTCC TCCCTGGTC CAAGATGAA CTTCAATGA AGACTCAGCC  
 ACGTGGAGA GAACGAGAG ACAGCCAG GTTCTACTT GAAGTTTACT TCTGAGTGG  
 14 ALA[HRSE] LEVALALEUL EUPROGLYSE RLYASPGLU LEUGLMMETL YS[HR]LNPRO  
 N-末端 ↑  
 121 CACAGATGCC ATTCCAGCTG CCCAGTCCAC TCCACCAGC TACACCAGTG AGGAGATAC  
 GIGICTACGG TAAGTGCAG GGGTCAGGTG AGGGTGGCG ATGGTCACT CCTCTCATG  
 34 [HR]SPALA LLEPROALVA LAGL[SE]RH [R]PRO[HRSE] TYR[HRSE]G LUGL[SE]RTHR  
 181 TTCAGTAG GACCTTCCA AGGAGCCTTC CATCTCAGA GAAGACTGA TTCCAAGA  
 AAGGICATTC CTGGAAAGT TCCCTCGAAG GTAGAAGTCT CTTCGACT AAAGTTTCT  
 54 [SE]RSELYS ASPLE[SE]L YSGLUPRO[SE]R LEPHEARG GLUGLLEUI LH[SE]LYASP  
 241 TAATGTGGT ATAGAATCTA CCAAGCCAGA GAATCAAGAG GCCCAGGATG GGCTCAGGAG  
 ATTACACAC TATCTTAGAT GGTTCGGTCT CTTAGTCTC CGGGTCTTAC CCGGTCTCTC  
 74 ASNVALVAL LLEGL[SE]R HR[LY]SPROGL UASNGLNGLU ALAGLNASP6 LYLEUARQ[SE]

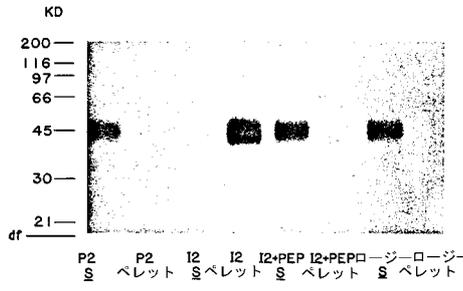
【 図 4 B 】

301 C66GTCACT CAGTGG6AAG AGACCACAG ACCCACACC CCACCTSCAA CCACCTCAGA  
 GCCCAGTAGA GTCGACCTTC TCGGIGITC TGGGIGITC AGTCGACGTI GGTGGAGICT  
 94 GLY[SE]SER GINLEUGLUG L[HR]HR[HR]R PRO[HR]HR SER[ALA]A[HR]HR[SE]RGLU  
 361 G6AAATCTG ACCAAGTCAA GCCAGACAGT GGAGGAAGA CTGGGTAATA TAATTGAAGG  
 CCTTTAGAC TGGTTCAGTI CGGTGIGICA CCTCTCTI GACCCATIT ATTAATCTC  
 114 GLUASWLEU [HR]LYSERS E[GLN]H[VA] LGLUGLUGLU LEUGLYYSI LEILEGLUGLY  
 421 ATTTGTAAT GGTGCAGAAG ACATAATCTC TGGTGCAGT CGTATCAG6A AGTCATGAAG  
 TAAACATIGA CCAGCTTTC TGTATTAGAG ACCACGGTCA GCATAGTCTC TCAGTACTTC  
 134 PHEVAL[HR] GLVALAGLUA SPIL[SE]RGLYAL[SE]R ARGIL[HR]L Y[SE]R  
 481 ACAAAAAC CTAACCACTA AGTCCCATGC TAGGTGGTGC CTTATCAGC CACATTTGCG  
 TGTITTTTGT GATTGGTGT TCAAGGTAGC ATCCACCAGC GAAGTAGTGC GTGTAAGAC  
 541 TCATCTGACC ACCACCTCTC AGTCTGCCCT TTGATGCTT ACATTAAGT ATTGCACCT  
 AGTAGACTGG TGGTGGAGAG TCAGACGG6A AACTACAGAA TGTAATITCA TACGTTGGA  
 601 AAAAAAAA  
 TTTTTTTT

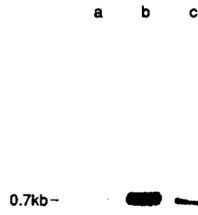
【 図 5 A 】



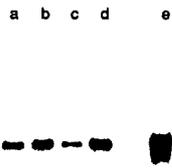
【 図 5 B 】



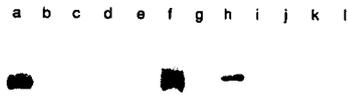
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



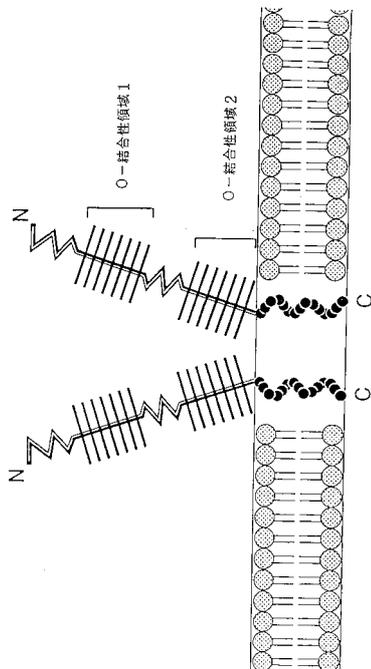
【 図 6 C 】



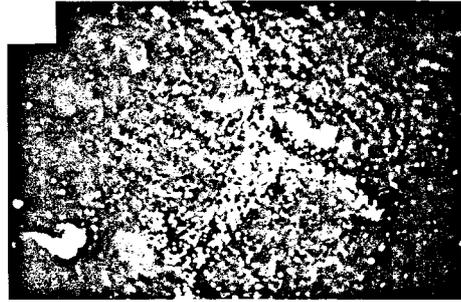
【 図 6 D 】



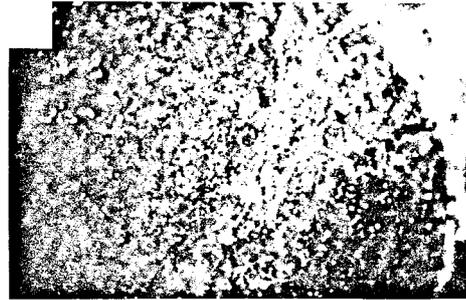
【 図 8 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

A 6 1 P	29/00	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	43/00	A 6 1 P	29/00	
C 1 2 N	15/09	A 6 1 P	29/00	1 0 1
C 1 2 Q	1/68	A 6 1 P	43/00	1 0 5
G 0 1 N	33/53	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/566	G 0 1 N	33/53	M
		G 0 1 N	33/566	

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100075225

弁理士 篠田 文雄

(72)発明者 ラスキー, ローレンス・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア 9 4 9 6 5、ソーサリト、スター・ルート・ボックス 4 6 0 番

(72)発明者 イマイ, ヤスユキ

アメリカ合衆国カリフォルニア 9 4 1 2 2、サン・フランシスコ、ロックスレー・アベニュー 1 7  
2 番、ナンバー・スリー

(72)発明者 ローゼン, スティーブン・ディー

アメリカ合衆国カリフォルニア 9 4 1 0 0、サン・フランシスコ、クレイトン・ストリート 8 2 8  
番

(72)発明者 シンガー, マーク・エス

アメリカ合衆国カリフォルニア 9 4 7 0 3、パークレイ、グラント・ストリート 1 9 1 5 番

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第 9 0 / 0 1 3 3 0 0 (W O , A 1 )

特表平 0 7 - 5 0 7 6 7 9 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int. Cl.<sup>7</sup>, D B 名)

C07K 16/00-16/46

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	选择配体		
公开(公告)号	<a href="#">JP3691467B2</a>	公开(公告)日	2005-09-07
申请号	JP2002228802	申请日	2002-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司 加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司 的, 摄政日, 本, 加州大学,		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司 的, 摄政日, 本, 加州大学,		
[标]发明人	ラスキーローレンスエイ イマイヤスユキ ローゼンステイーブンディー シンガーマークエス		
发明人	ラスキー, ローレンス・エイ イマイ, ヤスユキ ローゼン, ステイーブン・ディー シンガー, マーク・エス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/715 C07K14/78 C07K16/00 C07K16/28 C07K19/00 C12N5/00 C12N5/10 C12N5/09 C12N5/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 C07K14/70564 C07K14/70596 C07K16/28 C07K16/2854 C07K2317/34 C07K2319/00		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A A61K45/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P43/00.105 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C07K14/47 C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB022 4C084/ZB111 4C084/ZB151 4C084/ZB212 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	07/695805 1991-05-06 US 07/834902 1992-02-13 US		
其他公开文献	JP2003144181A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供编码选择蛋白配体的核酸，针对配体蛋白质部分的抗体，以及测量选择蛋白配体存在的方法。解决方案：提供了编码配体的核酸，制备它们的方法和手段，以及治疗与内皮细胞的循环白细胞过度结合相关的体征或症状的方法。还提供了将选择蛋白的糖蛋白配体给予需要这种治疗的患者的方法。

1 CTGACCTTGT TCCAGTCCCA TCATGAAATT CTTCACTGTC CTGCTATTG TCGACTTTCC  
 GACTGGAGA AGGTCAAGGT GGTACTTTAA GAAGTAGAG GACGATAAC AGTCAGAACG  
 1 METLYSPH EPHE<sup>TR</sup>HYAL LEUL<sup>EP</sup>HPHY ANSER<sup>EU</sup>MLAA  
 61 TCCACCCTCT CTTCCTCC TGCCTGGTC CAAGATGAA CTTCAATGA AGACTCAGCC  
 ACGGTGAGA GACGAGAGG ACGGACCCAG GTTCTACTT GAAGTTTACT TCTGACTGG  
 14 ALAN<sup>RSER</sup> LEVALALEUL EUPROGL<sup>QSE</sup> RL<sup>YS</sup>SP<sup>LU</sup> LEUL<sup>QWETL</sup> YS<sup>TRGR</sup>LN<sup>PRO</sup>  
 N-末端 ↓  
 121 CACAGATGCC ATTCCAGCTG CCGAGTCCAC TCCCAACGC TACACAGTG AGGAGGTAC  
 GTGTACGG TAAAGTGCAC GGGTCAGGTG AGGGTGGTC ATGTGGTAC TCCCTCATG  
 34 THR<sup>SP</sup>AL<sup>A</sup> LE<sup>PRO</sup>AL<sup>A</sup> LAG<sup>LN</sup>ER<sup>TH</sup> RP<sup>OT</sup>HR<sup>SE</sup> TH<sup>RSER</sup> LUG<sup>QSE</sup>TR<sup>H</sup>  
 181 TTCAGTAG GACTTTCCA AGGACCTTC CATCTCAGA GAAGACTGA TTCCAAGA  
 AAGTCATC CTGGAAAGT TCCTCGGAG GTAGAGCTT CTTCTGACT AAAGTTTCT  
 54 SER<sup>SE</sup>RL<sup>YS</sup> ASP<sup>LE</sup>Q<sup>ERL</sup> YS<sup>GL</sup>UP<sup>RO</sup>SE RL<sup>EP</sup>HP<sup>HRG</sup> GLUG<sup>LEUL</sup> L<sup>QSE</sup>RL<sup>YS</sup>ASP  
 241 TATGTGGTG ATAGATCTA CCAGGCCAGA GAATCAAGAG GCCCAGGATG GGTCAAGAG  
 ATTACCAC TATCTTAGAT GGTCTGGTCT CTTAGTGTG CCGGTCTAC CCGAGTCTC  
 74 ASN<sup>VAL</sup> ILE<sup>GL</sup>Q<sup>SE</sup>TR<sup>H</sup> YS<sup>PRO</sup>GL IAS<sup>GL</sup>NG<sup>LU</sup> ALAN<sup>SP</sup> L<sup>Y</sup>LEU<sup>MSER</sup>